



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

**“TOXICIDAD INDUCIDA POR LA MEZCLA DE ALUMINIO-IBUPROFENO EN EL BIOINDICADOR
PEZ CEBRA *DANIO RERIO*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS Y
TECNOLOGÍA FARMACÉUTICAS

Presenta:

M.C.Q. Livier Mireya Sánchez Aceves

Tutor académico

Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván

Tutores adjuntos

Dra. Hariz Islas Flores

Dr. Damià Barceló Cullerès

Toluca, México, Año 2021.

Índice

Abstract.	9
1. Resumen.	10
2. Introducción.	11
3. Antecedentes y generalidades.	13
3.1 Contaminación.	13
3.1.1 Contaminación del agua.	13
3.1.2 Contaminación del agua por metales.	14
3.1.3 Contaminación del agua por fármacos.	16
3.1.4 Mezclas de contaminantes en medios acuáticos.	18
3.2 Aluminio.	20
3.2.1 Generalidades.	20
3.2.2 Mecanismo de acción tóxica.	22
3.2.3 Ocurrencia.	23
3.2.4 Estudios de toxicidad.....	23
3.3 Ibuprofeno.	24
3.3.1 Generalidades.	24
3.3.2 Mecanismo de acción tóxica.	25
3.3.3 Ocurrencia.	26
3.3.4 Estudios de toxicidad.....	27
3.4 Biomarcadores.	28
3.4.1 Biomarcador de exposición.	29
3.4.2 Biomarcador de efecto.....	29
3.4.3 Biomarcadores de susceptibilidad.....	29
3.5 Estrés oxidativo.	29
3.5.1 Generalidades.	29
3.5.2 Efectos de EO sobre biomoléculas.	30
3.5.3 Mecanismos intracelulares de defensa antioxidante.	34
3.6 Embriotoxicidad y teratogénesis.	35
3.6.1 Generalidades.	35
3.6.2 Relación del EO con la Embriotoxicidad y Teratogénesis.	36
3.7 Bioindicadores.	38
3.7.1 Generalidades.	38
3.7.2 Pez cebra <i>Danio rerio</i>	38
3.7.3 Desarrollo de <i>Danio rerio</i>	40
4. Justificación.	42
5. Hipótesis.	43
6. Objetivos.	44
6.1 Objetivo general.	44

6.2 Objetivos específicos	44
7. Metodología	44
7.1 Estudio de toxicidad en juveniles	44
7.1.1 Materiales y reactivos.....	44
7.1.2 Mantenimiento de especímenes de <i>D. rerio</i>	45
7.1.3 Ensayos de toxicidad.....	45
7.2 Determinación del estrés oxidativo inducido por compuestos binarias	47
7.2.1 Determinación de Lipoperoxidación.....	47
7.2.2 Determinación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD).....	48
7.2.3 Determinación de la actividad de catalasa (CAT).....	48
7.2.4 Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPX).....	49
7.2.5 Determinación del contenido de proteínas totales.....	49
7.2.6 Análisis estadístico.....	50
7.3 Estudio de embriotoxicidad y teratogénesis	50
7.3.1 Materiales y reactivos.....	50
7.3.2 Mantenimiento de progenitores.....	50
7.3.3 Recolección de ovocitos.....	51
7.3.4 Ensayos de toxicidad de compuestos aislados.....	51
7.3.5 Ensayos de toxicidad de la mezcla binaria.....	52
7.3.6 Evaluación del desarrollo embrionario.....	52
7.3.7 Análisis de malformaciones y efectos teratogénicos.....	52
7.3.8 Evaluación de la frecuencia cardíaca.....	53
7.3.9 Análisis estadístico.....	53
8. Resultados	54
8.1 Biomarcadores de oxidación celular y actividad antioxidante	54
8.1.1 Resultados de Lipoperoxidación (LPO).....	54
8.1.2 Resultados de actividad de superóxido dismutasa (SOD).....	54
8.1.3 Resultados de la actividad de catalasa (CAT).....	55
8.1.4 Resultados de la actividad de glutatión peroxidasa (GPX).....	55
8.1.5 Interacciones aditivas.....	60
8.2 Resultados embrioletalidad y teratogénesis	63
8.2.1 Datos de embrioletalidad de formas aisladas y la mezcla binaria de Al e IBU.....	63
8.2.2 Principales efectos teratogénicos y alteraciones morfológicas del desarrollo embrionario.....	65
8.2.3 Puntaje de desarrollo de embriones de <i>D. rerio</i>	75
8.2.4 Evaluación de la frecuencia cardíaca.....	77
9. Discusión	78
9.1 Discusión de resultados	78
9.1.1 Biomarcadores de oxidación celular.....	78
9.1.2 Resultados de biomarcadores de actividad antioxidante.....	87
9.1.3 Resultados de embriotoxicidad y teratogénesis.....	90
10. Conclusiones	97
11. Referencias	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Ventajas y desventajas del uso de <i>D. rerio</i> en estudios de toxicidad.	39
Tabla 2 Síntesis de las etapas de desarrollo de <i>Danio rerio</i>	40
Tabla 3 Valores de los biomarcadores de las interacciones aditivas	61
Tabla 4 Porcentajes de embriones muertos y teratogénicos después de la exposición a formas y mezclas aisladas de IBU y Al.....	64
Tabla 5 Fotografías representativas de las principales malformaciones encontradas en embriones de <i>Danio rerio</i>	67
Tabla 6 Porcentajes de malformaciones más frecuentes de los valores reales y las interacciones aditivas calculadas entre IBU y Al	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Determinación de LPO en cerebro, branquias, hígado e intestino de <i>Danio rerio</i>	56
Figura 2 Actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD) en cerebro, branquias, hígado e intestino de <i>Danio rerio</i>	57
Figura 3 Actividad enzimática de la catalasa (CAT) en cerebro, branquias, hígado e intestino de <i>Danio rerio</i>	58
Figura 4 Actividad enzimática glutatión peroxidasa (GPX) en cerebro, branquias, hígado e intestino de <i>Danio rerio</i>	59
Figura 5 Supervivencia, mortalidad y malformaciones cuantificadas en embriones	72
Figura 6 Frecuencia de malformaciones inducidas por formas aisladas de IBU, Al y la mezcla en embriones de <i>D. rerio</i>	74

Figura 7 Curvas de concentración-respuesta de IBU, Al (b) y la mezcla (c) en embriones de *D. rerio*.....76

Figura 8 Frecuencia cardíaca de las larvas de pez cebra (72 hpf) expuestas a diferentes concentraciones de ibuprofeno, aluminio y la mezcla binaria.....77

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINE's	Antiinflamatorios no esteroideos
AlCl ₃	Cloruro de Aluminio
ANOVA	Análisis de varianza
API's	Ingredientes activos farmacéuticos
CAT	Catalasa
CE ₅₀	Concentración efectiva media
CEM	Coefficiente de extinción molar
CL ₅₀	Concentración letal media
CYP450	Citocromo P450
DCF	Diclofenaco
DOC	Carbono Orgánico Disuelto
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético

EO	Estrés oxidativo
ERO's	Especies reactivas de oxígeno
ERN's	Especies reactivas de nitrógeno
EPA	Environmental Protection Agency
FBC	Factor de bioconcentración
GPX	Glutación peroxidasa
HEPES	4(2-hidroxietil)-1 ácido piperazina etano sulfónico
IBU	Ibuprofeno
IT	Índice Teratogénico
LPO	Lipoperoxidación
M1	Mezcla 1
M2	Mezcla 2
MDA	Malondialdehído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
NPX	Naproxeno
NO	Óxido nítrico
OH	Hidroxi
PBS	Amortiguador de fosfatos salino

PCP's	Productos de cuidado personal
PCM	Paracetamol
pH	Potencial de hidrógeno
POP's	Contaminantes Orgánicos Persistentes
PT	Proteínas totales
PT	Productos de transformación
PTAR's	Plantas de tratamiento de aguas residuales
SOD	Superóxido dismutasa
TBARS	Especies reactivas de ácido tiobarbitúrico
UI	Unidades internacionales

Abstract.

Despite the ubiquitous presence of multiple pollutants in aqueous environments have been extensively demonstrated, the ecological impact of chemical cocktails has not been studied in depth. In recent years, environmental studies have mainly focused on the risk assessment of isolated chemical substances neglecting the effects of complex mixtures even though it has been demonstrated that combined effects exerted by pollutants might represent a greater hazard to the biocenosis. The current study aimed to evaluate the oxidative stress status, developmental alterations and teratogenic effects induced by isolated forms and binary mixtures of ibuprofen (IBU) and aluminum (Al) at environmentally relevant concentrations on juveniles and embryos of *Danio rerio*. Juveniles were exposed to isolated forms of Ibuprofen and Aluminum (0.01 up to 11 µg/L and 0.05 mg/L up to 6 mg/L, respectively) and two mixtures for 7, 14, 21 and 28 days. After exposure, brain, gills, liver and gut were extracted and biomarkers of cell oxidation such as lipid peroxidation (LPO) as well as antioxidant enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX) were evaluated. On the other hand, oocytes were exposed for 12, 24, 48, 72 and 96 h to IBU (0.1-20 µg L⁻¹), Al (0.01-8 mg L⁻¹) and one binary mixture. The evaluation of embryonic development was performed and the LC50 and EC50 were obtained to calculate the Teratogenic Index (TI) of both substances. Results show that both, the isolated forms and mixtures were capable to promote the production of radical species and altered the oxidative stress status in all evaluated tissues of zebrafish juveniles. Moreover, hatching alterations, skeletal malformations, cardiac impairment and delays to embryonic development were observed. In all cases the toxic response was altered by the interaction of both substances.

1. Resumen.

A pesar de que se ha demostrado ampliamente la presencia ubicua de múltiples contaminantes en ambientes acuáticos, el impacto ecológico de los cócteles químicos no se ha estudiado en profundidad. En los últimos años, los estudios ambientales se han centrado principalmente en la evaluación de riesgos de sustancias químicas aisladas despreciando los efectos de mezclas complejas, aunque se ha demostrado que los efectos combinados que ejercen los contaminantes pueden representar un mayor peligro para la biocenosis. El presente estudio tiene por objetivo la evaluación del estado de estrés oxidativo, las alteraciones al desarrollo y los efectos teratogénicos inducidos por formas aisladas y mezclas binarias de ibuprofeno (IBU) y aluminio (Al) en concentraciones ambientalmente relevantes en organismos juveniles y embriones de *Danio rerio*. Los juveniles fueron expuestos a formas aisladas de ibuprofeno y aluminio (0.01 y 11 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 0.05 mg L^{-1} hasta 6 mg L^{-1} , respectivamente) y dos mezclas durante 7, 14, 21 y 28 días. Después de la exposición, se extrajeron el cerebro, las branquias, el hígado y el intestino y se evaluaron biomarcadores de oxidación celular como la peroxidación lipídica (LPO) y la actividad enzimática antioxidante de la enzima superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX). Por otro lado, los ovocitos fueron expuestos durante 12, 24, 48, 72 y 96 h a IBU (0.1-20 $\mu\text{g L}^{-1}$), Al (0.01-8 mg L^{-1}) y una mezcla binaria. Se realizó la evaluación del desarrollo embrionario y se obtuvieron las CL_{50} y CE_{50} para calcular el Índice Teratogénico (IT) de ambas sustancias. Los resultados muestran que tanto las formas aisladas como las mezclas fueron capaces de promover la producción de especies radicales y alterar el estado de estrés oxidativo en todos los tejidos evaluados de juveniles de pez cebra. Además, se observaron alteraciones de la eclosión, malformaciones esqueléticas, deterioro cardíaco y retrasos en el desarrollo embrionario. En todos los casos la respuesta tóxica se vio alterada por la interacción de ambas sustancias.

2. Introducción.

Las descargas acuáticas de contaminantes químicos se han convertido en uno de los temas de preocupación más relevantes para la comunidad científica en los últimos años. Se sabe que la liberación constante de sustancias naturales y antropogénicas en el medio acuático, incluso a niveles traza, promueve efectos nocivos no solo en el sistema acuático en sí, sino también en la biocenosis debido al ingreso, uso, destino y la eliminación incompleta de contaminantes en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR's) (Gorito et al., 2017; Radović et al., 2015).

Los metales son sustancias que presentan alta conductividad eléctrica, térmica, maleabilidad, facilidad de oxidación y alta densidad. Existen tres principales fuentes de emisión de metales en el ambiente. El más evidente de ellos es el proceso de extracción y purificación (minería, fundición y refinación). El segundo menos conocido, es la emisión de gases por combustión de carbón y petróleo. La tercera y más diversa, es la producción y utilización de productos industriales que los contienen y que van aumentando al descubrirse nuevas aplicaciones de estos (Joseph et al., 2019; Kim et al., 2019). Los principales reservorios abióticos de los contaminantes son: la columna de agua, los sedimentos suspendidos y el agua intersticial (El Azhari et al., 2017). La gran mayoría de los metales tóxicos, tienden a acumularse en el fondo de los sedimentos, desde los cuales pueden ser liberados a través de varios procesos de removilización, y a lo largo de la cadena trófica (Vu et al., 2017). Dentro de estos metales se encuentran el plomo, mercurio, arsénico, cadmio, cromo, hierro y aluminio (Mahdi Ahmed et al., 2017).

Por otro lado Barceló & López (2008) mencionan que desde hace unos años el rápido desarrollo de métodos de análisis más sensibles y eficaces ha permitido alertar a la comunidad científica en todo el mundo de la presencia de un tipo de contaminantes, potencialmente peligrosos, llamados contaminantes de preocupación emergente. Grupos como drogas ilícitas y de abuso, productos

farmacéuticos y de cuidado personal (PCPs), bisfenoles, retardantes de llamas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos policlorados y polibromados, pesticidas polares, nano materiales y aditivos alimentarios han sido ampliamente detectados en diferentes cuerpos de agua a concentraciones que van de ng/L hasta $\mu\text{g/L}$ y cuyos efectos todavía no han sido estudiados con amplitud (Lapworth *et al.*, 2012).

Aunado a la detección ambiental de contaminantes químicos convencionales y de preocupación emergente, los efectos nocivos derivados de su ocurrencia en el medio acuático pueden ser determinados a partir del daño tóxico inducido en los organismos pertenecientes a los compartimientos afectados (Gonzalez-Rey & Bebianno, 2012a). Metodológicamente es recomendable que los ensayos de toxicidad se lleven a cabo con especies a distintos niveles de la cadena trófica; dentro de estos se pueden mencionar los peces teleósteos, organismos ampliamente empleados en bioensayos con múltiples fines. El pez cebra *Danio rerio* posee una serie de ventajas por encima de otros organismos bioindicadores entre los que destaca su sensibilidad a los compuestos tóxicos además de su fácil manejo a nivel de laboratorio (Kari *et al.*, 2007)

Diversos estudios en todo el mundo han demostrado que compuestos como los AINE's y los metales pesados son ampliamente encontrados en cuerpos de agua contaminados con aguas provenientes de efluentes domésticos, industriales y hospitalarios (Pérez-Alvarez *et al.*, 2018; Sousa *et al.*, 2018), lo que indica su continua introducción al medio, relativa persistencia y la baja tasa de eliminación en las PTAR's cuando se llevan a cabo tratamientos convencionales de remoción. Todas las características anteriormente mencionadas los convierten en candidatos ideales para convertirse en marcadores de contaminación de aguas domésticas en ambientes acuáticos, particularmente en aguas superficiales y sedimentos (Oberholster *et al.*, 2012a; Parolini & Binelli, 2012; Voigt *et al.*, 2015)

3. Antecedentes y generalidades.

3.1 Contaminación.

El término contaminación se refiere a la presencia en el ambiente, de cualquier forma, de sustancia de origen biótico o abiótico como son la energía o compuestos de naturaleza química, física o biológica que generan un detrimento en la calidad de vida, el bienestar de la biocenosis o las condiciones propias del ecosistema. La contaminación es una consecuencia negativa del aumento en los procesos productivos que afectan a la salud humana y a la integridad de los ecosistemas, ocasionando daños que en ocasiones se vuelven irreversibles, entre los que se destaca la pérdida de biodiversidad (Barrera-escorcia, 2004).

Hasta hace unos años, la mayoría de los estudios y regulaciones alrededor del mundo sobre sustancias químicas y su impacto en el medio ambiente se centraban en la acción de contaminantes convencionales como metales pesados, bifenilos policlorados y polibromados, plaguicidas y contaminantes orgánicos persistentes (POP's). Sin embargo, actualmente el crecimiento demográfico, el cambio climático, las emisiones industriales, la inefectiva disposición de residuos, la falta de normatividad referente a la presencia de micro contaminantes en el medio, los derrames accidentales y las actividades de consumo están repercutiendo de manera significativa e insostenible en el ecosistema, impactado de forma severa en uno de los recursos más esenciales, el agua (Becerril ,2009).

3.1.1 Contaminación del agua.

El agua es un recurso esencial para la supervivencia humana; la introducción de sustancias de origen biológico, químico o físico que da lugar a alteraciones en la composición, contenido o calidad de los cuerpos de agua como resultado de actividades naturales y humanas, se denomina contaminación del medio acuático. De acuerdo con Notvony (2003) los principales contaminantes

del agua se pueden clasificar en los siguientes grupos: a) agentes biológicos patógenos, b) desechos y compuestos orgánicos, c) compuestos y nutrientes vegetales inorgánicos, d) materiales suspendidos y sedimentos, e) aditivos industriales y alimentarios y f) contaminantes físicos incluyendo la contaminación térmica.

Las fuentes de contaminación del agua se atribuyen generalmente a tres sectores: social, debido a la generación de residuos de origen municipal y hospitalario; agropecuario, por el uso de herbicidas, plaguicidas y abonos químicos; e industrial, por la generación y liberación de residuos a los sistemas de drenaje (Hernández, 2002). De acuerdo con el ciclo del agua, las principales fuentes de ingreso de contaminantes en el medio acuático son las aguas residuales, en las que confluyen los efluentes municipales, hospitalarios, industriales y las provenientes de sectores primarios como agricultura y ganadería (Farré et al., 2008; González-Alonso et al., 2017)

Actualmente es complejo precisar los riesgos derivados de la presencia de sustancias tóxicas en los cuerpos de agua debido a la diversidad de su naturaleza fisicoquímica, concentraciones bajas en algunos casos a niveles traza y al hecho de que no se encuentran de forma aislada, sino como parte de mezclas heterogéneas de compuestos, por lo que los efectos nocivos en todos los niveles difícilmente pueden ser imputados a un contaminante en particular.

3.1.2 Contaminación del agua por metales.

Actualmente, el cuidado de la calidad del agua es considerado una de las mayores preocupaciones para la humanidad, ya que es un recurso esencial para la subsistencia. Los recursos hídricos están siendo altamente contaminados por sustancias químicas de distinta naturaleza a un ritmo paralelo con el aumento demográfico y el incremento de las actividades antropogénicas cerca de grandes cuerpos de agua (Zubair Alam et al., 2010). Dentro de los grupos de contaminantes más importantes se encuentran los metales pesados, que representan un problema mundial debido a

que presentan una alta la persistencia a largo plazo en los suelos y el agua y una alta capacidad para bioacumularse en los tejidos de los organismos vivos, lo que aumenta los riesgos geológicos y ecológicos e incumple los ciclos biogeoquímicos naturales (Chabukdhara & Nema, 2012; W. X. Liu et al., 2003). Debido a procesos geológicos naturales y actividades humanas como la minería, agricultura y ganadería y los procesos industriales de manufactura, la producción y liberación de una importante cantidad de metales pesados al medio acuático se vuelve continua y casi inevitable. Los metales pesados, tanto los esenciales como el hierro, zinc y cobre como los no esenciales entre los que destaca el aluminio, presentan efectos tóxicos en la biota (Gómez-Oliván et al., 2017). En un intento por reducir la descarga de metales pesados en sistemas acuáticos, desde hace varios años se están aplicando medidas preventivas entre las que destacan normas de carácter doméstico como por ejemplo el Acuerdo Por El Que Se Establecen Los Criterios Ecológicos De Calidad Del Agua Ce-Cca-001 / 89 en México el cual establece entre otros aspectos los límites máximos permisibles de metales pesados para la protección de la vida acuática (SEDUE, 1989) e internacionales como el *Final Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria for Aluminum* 2018 (EPA, 2017), en el cuál se establecen recomendaciones en el contexto de la calidad de agua con respecto a la presencia de aluminio, sin embargo aún con estos esfuerzos la presencia de metales pesados en el medio acuático sigue siendo relevante. Por ejemplo, Edokpayi et al., (2018) estudiaron la contaminación por metales pesados en el río Mvudi en Sudáfrica y observaron que la descarga de efluentes de aguas residuales parcialmente tratadas de una PTAR, efluentes provenientes de actividades agrícolas y los vertederos cercanos al río son responsables de la alta presencia de metales pesados. Yazidi et al., (2017) evaluaron la contaminación por metales pesados en el lago Ichkeul al norte de Tunisia, y descubrieron que la liberación incontrolada de desechos domésticos, efluentes industriales y las aguas residuales resultan ser los responsables de la contaminación por metales pesados en el agua del lago. Además, Tenorio-

Chávez et al., (2020) encontraron una amplia presencia de metales como cadmio, cobre, plomo, mercurio y zinc en un efluente tratado perteneciente a un hospital en Puebla, México.

3.1.3 Contaminación del agua por fármacos.

Tradicionalmente, los estudios científicos y de monitoreo ambiental se han centrado en la detección y cuantificación de contaminantes convencionales, los cuales aún cuando han demostrado ser compuestos que vulneran el correcto cuidado y el adecuado mantenimiento del equilibrio ecológico, no son los únicos compuestos que deben de ser tomados en cuenta para el mantenimiento de la calidad del agua. Investigaciones recientes han revelado la existencia de otros contaminantes ambientales importantes que debido a la falta de técnicas e instrumentos adecuados, no había sido reconocidos con anterioridad (Richardson & Ternes, 2014). Muchos de estos contaminantes no generan toxicidad como algunos de los contaminantes convencionales anteriormente mencionados, sino que ejercen sus efectos de formas más agudas, por ejemplo, a través de la alteración bioquímica. Y, si bien muchos de estos contaminantes emergentes pueden bioacumularse, sus mecanismos de distribución, absorción y su persistencia son completamente diferentes a los contaminantes convencionales. Como resultado, la mayoría de estos contaminantes emergentes tienen propiedades y efectos sumamente variados. Si bien algunos de ellos son motivo de preocupación para la salud humana, se ha demostrado que la vida acuática presenta una mayor vulnerabilidad. Y, si bien estos contaminantes a menudo se denominan de preocupación emergente, la mayoría han formado parte de los ecosistemas desde hace muchos años, sin embargo, su relevancia surgió a partir de la aparición de instrumentos altamente sensibles y apropiados para su detección (Richardson & Kimura, 2017).

Los productos farmacéuticos y sus productos de transformación (PT) se consideran contaminantes de preocupación emergente. La amplia presencia de ingredientes farmacéuticos

activos (API) en el medio acuático es el resultado del consumo humano y veterinario irracional, la alta persistencia, biodisponibilidad y excreción metabólica, así como la falta de tratamientos de eliminación eficaces en las PTAR's (Khetan & Collins, 2007; Vasquez et al., 2014). Diseñados para llevar a cabo una actividad biológica a bajar concentraciones, es muy probable que los productos farmacéuticos ambientales induzcan efectos nocivos en especies no objetivo debido a una exposición crónica (Ginebreda et al., 2010). Después de su ingesta, los productos farmacéuticos son absorbidos tanto por humanos como por animales para ser degradados a través de vías metabólicas, sin embargo, algunas fracciones permanecen como compuestos padres o como metabolitos activos que se descargan en las aguas residuales domésticas para su tratamiento (Khetan & Collins, 2007). La eliminación incompleta de contaminantes orgánicos con tratamientos convencionales en las PTAR's municipales contribuye a las descargas de compuestos tóxicos al medio ambiente (Sousa et al., 2018). La reciente preocupación por la creciente presencia de fármacos en el medio acuático se ha visto reflejada en acciones internacionales como la llevada a cabo por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) con la creación de la Guía para la Evaluación del Riesgo Ambiental de Productos Medicinales para Uso Humano, cuyo objetivo fue la evaluación de los potenciales riesgos generados por la presencia de fármacos en el ecosistema; por otro lado en el año 2010 el Parlamento Europeo extendió la legislación aplicable en farmacovigilancia al campo de la ecofarmacovigilancia y más recientemente la Comisión Europea añadió el 17 α -etinil estradiol, el 17 β -estradiol y el diclofenaco a su lista de observación en el marco de la directiva (2013/39/EU) para su evaluación y futura inclusión en la lista de sustancias prioritarias (Mezzelani et al., 2016). Las principales fuentes de ingreso de fármacos al ecosistema son a partir de la excreción humana y veterinaria, actividades industriales, PTAR's entre otros (Khadir et al., 2020). Estudios sobre remoción de fármacos con tratamientos convencionales reportan que esta se lleva a cabo de forma incompleta generando con ello que su liberación al

ambiente resulte ser continua y ubicua. Se ha comprobado que las plantas de tratamiento de aguas residuales son la mayor fuente de ingreso de fármacos al ambiente ya que los compuestos farmacéuticos inalterados y sus metabolitos son excretados a través de las heces y la orina, formando parte de los efluentes municipales y hospitalarios cuyo destino son las plantas de tratamiento (Na et al., 2013). En China, Liu et al., (2017) encontraron que únicamente el 14% de los fármacos son removidos con una eficiencia del 71%, mientras que el 52% de los fármacos estudiados tuvieron una tasa de remoción menor al 30%. Los grupos terapéuticos de alto consumo, como los antibióticos, los fármacos contra el cáncer, los estrógenos, los antidepresivos, los beta-bloqueadores y los fármacos antiinflamatorios, han demostrado su ubicuidad en el medio acuático y sus efectos tóxicos a través de una amplia gama de mecanismos (Al Aukidy et al., 2012; Láng & Kohidai, 2012).

3.1.4 Mezclas de contaminantes en medios acuáticos.

En la actualidad la Evaluación del Riesgo Ecotoxicológico requiere del análisis de las interacciones entre compuestos que pueden ser encontrados en efluentes de diversos orígenes (Laquaz et al., 2018). Las sustancias químicas por lo general forman parte de mezclas, las cuales pueden ser producidas de forma intencional para potenciar su efecto (productos farmacéuticos, agentes de limpieza, combustibles, plaguicidas, etc.) o de forma no intencionada debido al uso específico de cada compuesto. El modelo de sinergismo/antagonismo se puede determinar a partir de un análisis isoblográfico, el cuál provee información esencial para la evaluación de las respuestas biológicas inducidas por las mezclas de agentes, pudiendo con ello determinar si resultan menores, mayores o iguales que aquellas respuestas individuales esperadas para cada componente de la mezcla (Nwanyanwu & Adieze, 2017). Los principios generales de toxicidad de mezclas mencionan tres tipos básicos de modos de acción de compuestos en mezclas, (1) Acción similar (adición

dosis/concentración), (2) Acción distinta (independiente), (3) Interacciones. Para mezclas de sustancias químicas de acción similar, los efectos se pueden estimar directamente a partir de la suma de las dosis / concentraciones, escaladas por toxicidad relativa (adición de dosis / concentración) (Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), 2005).

Para mezclas de sustancias químicas que actúan de forma independiente, los efectos pueden estimarse de forma directa a partir de la probabilidad de respuestas de los componentes de forma individual (adición de respuesta) o la suma de respuestas biológicas (adición de efectos).

Ambos conceptos se basan en el supuesto de que los productos químicos en una mezcla no influyen en la toxicidad del otro, es decir, no interactúan entre sí en el sitio diana (Kortenkamp et al., 2019). La interacción describe el efecto combinado de dos o más sustancias químicas como más fuerte (sinérgico, potenciador, supra-aditivo) o más débil (efecto antagonista, inhibidor, sub-aditivo, infra-aditivo) de lo que se esperaría sobre la base de la adición o respuesta aditiva dosis / concentración. Por lo tanto, las interacciones pueden variar según los niveles de dosis relativos, la vía, el momento y la duración de la exposición (incluida la persistencia biológica de los componentes de la mezcla) y la diana biológica (Kortenkamp et al., 2019).

Los ejemplos de interacciones incluyen (Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), 2005):

- Interacciones toxicocinéticas; estas son una causa común de desviaciones de la aditividad.
- Interacciones metabólicas: modifican el metabolismo de otros componentes de la mezcla;
- Interacciones toxicodinámicas: interacciones entre las respuestas biológicas resultantes de la exposición a sustancias químicas individuales.

3.2 Aluminio.

3.2.1 Generalidades.

El aluminio (Al) es el metal más abundante en la corteza terrestre, se distribuye de manera ubicua en ambientes naturales debido a su complejo ciclo biogeoquímico (García-Medina et al., 2011; Schroniltgen et al., 2007). Este metal puede ser liberado de fuentes naturales como procesos geológicos incluyendo actividad volcánica y meteorización, deposiciones atmosféricas y acidificación de sistemas acuáticos y, en mayor medida, actividades antropogénicas principalmente combustión de compuestos fósiles, industria manufacturera que comprende utensilios para el hogar, latas, alimentos, cosméticos, fármacos, papel, herbicidas, automóviles, entre otros, minería, agricultura y procesos de tratamiento de aguas residuales (Authman, 2015; Bondy, 2010; Fernández-Dávila et al., 2012a; Long et al., 2017; Michelena et al., 2016). En lagos y presas el $Al_2(SO_4)_3$ es utilizado como agente clarificante al lograr la reducción en el desarrollo de fitoplancton. Aunado a ello, es altamente utilizado en las plantas depuradoras para precipitar sólidos en suspensión durante el tratamiento de aguas residuales (Vilando et al., 2019). El aluminio se considera un metal traza no esencial para la biota, su biodisponibilidad y, por lo tanto, su toxicidad se ven fuertemente afectadas por los parámetros fisicoquímicos del medio acuático, incluidos el pH, la dureza total, el carbono orgánico disuelto (DOC) y la temperatura (DeForest et al., 2018a; Santore et al., 2018; Trenfield et al., 2012a). Sin embargo, los estándares y las guías regulatorias de calidad del agua en muchos países consideran su toxicidad como un valor único sin tomar en cuenta la química de los cuerpos de agua. Esto puede conducir a una protección excesiva o insuficiente de la vida acuática en diferentes matrices. Se considera que el parámetro más importante para determinar la forma química del Al presente en el agua es el pH ya que este influye en la especiación y solubilidad del metal, sin embargo, otros parámetros fisicoquímicos del medio también influyen significativamente en su forma química y por lo tanto su distribución y

biodisponibilidad (Cardwell et al., 2018a). La presencia de Al en ambientes acuáticos muestra una gran variabilidad de formas, desde las formas trivalentes Al^{3+} , $AlOH^{2+}$, $Al(OH)^{2+}$, $Al(OH)_3$, $Al(OH)^4$ hasta complejos inorgánicos con sulfato (SO_4^{-2}), cloruro (Cl^-), fluoruro (F^-) y especies orgánicas como los ácidos fúlvico y húmico según la química del agua (DeForest et al., 2018a). El aumento de la acidez en el sistema acuático, y la consecuente liberación de formas lábiles de aluminio, son fenómenos comunes en regiones que poseen una baja capacidad de amortiguación, lo que ocurre principalmente en épocas donde es común el deshielo, durante tormentas intensas generadas después de largos periodos de sequía o en suelos pobres en nutrientes afectados por la precipitación ácida (Allin & Wilson, 2000; Epa, 2011).

Las sales de aluminio (Al) son utilizadas como agentes coagulantes en los procesos de purificación del agua y como aditivo alimentario. En humanos, la exposición a Al puede ocurrir como resultado de la inhalación a través del aire, el consumo de agua potable, la preparación y almacenamiento de alimentos, el uso de anti transpirantes, antiácidos, vacunas y procedimientos de inmunoterapia, entre otros (Dzulfakar et al., 2011). Su forma más común es como catión trivalente y su principal vía de absorción en el organismo es a través del tracto gastrointestinal (Rawy et al., 2013). La tasa de absorción del Al es cercana al 0.2% y una vez que se encuentra formando parte de la circulación sanguínea, alrededor del 90% del metal se une a la proteína sérica de transporte de hierro, la transferrina (Harris et al., 2003) para ser distribuido por todo el organismo. Se ha comprobado que el Al^{3+} puede traspasar la barrera hematoencefálica a través del proceso de endocitosis mediada por receptores de la proteína transportadora de Fe y en modelos murinos se reporta que aproximadamente el 0.005% de los complejos del metal ingresan al cerebro (Yokel et al., 2006). Hasta hace pocos años, el aluminio se consideraba poco peligroso para el ambiente, ya que, en solución, las sales de Al^{3+} forman compuestos monoméricos hidroxilados que al paso del tiempo se convierten en polímeros y partículas coloidales, lo que genera que su absorción se vea

dramáticamente limitada y por ello era considerado inocuo, sin embargo, en los últimos años diversos estudios han comprobado que este metal es capaz de inducir distintas respuestas tóxicas nocivas en organismos vivos incluyendo al hombre, otros mamíferos y animales acuáticos (Bondy, 2010). Los metales pesados no pueden ser destruidos por degradación biótica y por ello tienen la capacidad de acumularse en los organismos acuáticos a través de la cadena trófica y, en consecuencia, en los seres humanos que dependen de los productos acuáticos como fuente de alimentación (Ashraf, 2005).

3.2.2 Mecanismo de acción tóxica.

En general, los mecanismos de toxicidad de Al en organismos acuáticos están relacionados con la alteración de la homeostasis de metales y iones esenciales incluyendo calcio, potasio, magnesio, zinc, hierro y cobre en las células y centros catalíticos de enzimas esenciales para el mantenimiento de la homeostasis celular (J. Wu et al., 2005), alteraciones iónicas y osmorregulatorias (Grassie et al., 2013), agotamiento respiratorio debido a daños a nivel de branquias (Voigt et al., 2015), así como aumento en la mucosidad, hipoxia, acidosis metabólica, hipercapnia, y finalmente falla respiratoria (Allin & Wilson, 2000) debido a la deposición de precipitados insolubles en tejidos susceptibles. Aunado a ello, este metal forma complejos con grupos sulhidrilo (SH), produciendo daño oxidativo en biomoléculas al aumentar las especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares a través de diversos mecanismos (Griffitt et al., 2008; Kumar & Gill, 2014; Maya et al., 2016a). Se ha estudiado su papel como neurotoxina y se ha comprobado que el metal tiene la capacidad para unirse a las enzimas fenilalanina y tirosina hidroxilasas las cuales participan en los mecanismos de síntesis de las catecolaminas, alterando con ello su liberación en el SNC y por lo tanto la respuesta de los organismos al estrés (Fernández-Dávila et al., 2012a; Sánchez-Iglesias et al., 2009a). Por otro lado, otro de los mecanismos más aceptados es la alteración en el equilibrio

redox con el consecuente aumento en el estrés oxidativo vinculado a las reacciones de Fenton (Ruipérez et al., 2012; Valko et al., 2005)

3.2.3 Ocurrencia.

El Al puede alcanzar niveles de μg hasta mg L^{-1} en diferentes sistemas acuáticos. Valores de concentración del metal entre 6.04 y 24.45 mg L^{-1} fueron detectados en diversos sitios de muestreo del embalse Madin en México (González-González et al., 2014a). Según (G. Li et al., 2016) se encontraron concentraciones de Al de 102 a 818 $\mu\text{g L}^{-1}$ en el agua superficial del lago Chaohu en China, mientras que Reutova et al., (2018) detectaron concentraciones que oscilaron entre 65 y 625 $\mu\text{g L}^{-1}$ de aluminio en 4 muestras de ríos diferentes en el Cáucaso central. De acuerdo a datos reportados en el Portal de datos de calidad del agua (Water Quality Data Portal) en Estados Unidos entre los años 1991 a 2017, fueron recolectados un total de 7,483 muestras de agua superficial (4,991 muestras filtradas y 2,492 sin filtrar) para llevar a cabo el análisis de aluminio disuelto y aluminio total, respectivamente, encontrando concentraciones de aluminio disuelto de 0.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ - 20,600 $\mu\text{g L}^{-1}$ y de aluminio total de 0.9 $\mu\text{g / L}$ como mínimo y una concentración total máxima reportada de 210,000 $\mu\text{g / L}$ (EPA, 2017). Diversos estudios han demostrado que la exposición a altas concentraciones de Al es capaz de desencadenar una amplia gama de mecanismos de toxicidad en diferentes modelos animales (Martínez-vieyra et al., 2017; Mathiyazahan et al., 2015).

3.2.4 Estudios de toxicidad.

La exposición a Al en humanos presenta diversos efectos tóxicos. La acumulación del metal en varios órganos principalmente riñón e hígado fue observada en pacientes sometidos a tratamientos de diálisis o nutrición parenteral prolongada (García-Medina et al., 2011). Mientras que en los mamíferos, se cree que la exposición a aluminio es un factor importante en la patología de diversos trastornos neurodegenerativos, en particular las enfermedades de Alzheimer y Parkinson

(Esparza et al., 2011; Mathiyazahan et al., 2015), esclerosis lateral amiotrófica (Maya et al., 2016a; McLachlan et al., 2019) y demencia senil (Reutova et al., 2018), en organismos acuáticos la exposición ambiental a Al se ha relacionado con la inducción de estrés oxidativo (Fernández-Dávila et al., 2012a; García-Medina et al., 2011), geno y citotoxicidad (Martínez-vieyra et al., 2017; Quiroga-Santos et al., 2021) embriotoxicidad y malformaciones teratogénicas (Kovřížnych et al., 2013; Monaco et al., 2017), cambios conductuales y alteraciones morfológicas (Allin & Wilson, 2000; Anandhan & Hemalatha, 2009; Grassie et al., 2013; Griffitt et al., 2008), cambios iónico y osmo regulatorios (Rub et al., 2014), disrupción endócrina, modificación en diversos parámetros hematológicos y del metabolismo de la glucosa (Sánchez-Iglesias et al., 2009b; Vuorinen et al., 2003; Ward et al., 2006), neurotoxicidad (Fernández-Dávila et al., 2012a; Monaco et al., 2017) entre otros.

3.3 Ibuprofeno.

3.3.1 Generalidades.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) comúnmente utilizados para el alivio del dolor y otros trastornos inflamatorios, es un grupo heterogéneo que comparte acciones terapéuticas y efectos adversos (Méndez-Arriaga et al., 2008). Este grupo comprende el ácido acetilsalicílico (AAS), diclofenaco (DCF), naproxeno (NPX), paracetamol (PCM) e ibuprofeno (IBU) (Bally et al., 2017).

El ibuprofeno (ácido 2-[4-(2-metilpropil)fenil] propanoico) es un fármaco de venta libre altamente consumido debido a sus propiedades antipiréticas, analgésicas y antiinflamatorias (Islas-Flores et al., 2014; Jamil et al., 2016). El IBU es un ácido débil mayormente absorbido vía intestinal. En cuanto a su distribución, el IBU se fija en un 99 % a proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina y sigue dos principales rutas de biotransformación en el cuerpo humano (1) Fase I: en la cual se forma metabolitos hidroxilados en su mayoría (citocromo P450C9), y la Fase II: donde se

forma el glucurónido de ibuprofeno y glucurónidos de OH-ibuprofeno, que resultan tóxicos debido a la formación de iso-glucurónidos electrofílicos. Finalmente el IBU es eliminado a través de la orina y la bilis (Engbers et al., 2020; Millecam et al., 2019)

El IBU actúa como un inhibidor no selectivo del sistema enzimático ciclooxigenasa, en particular COX-1 y COX-2, involucrados en la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (L. H. M. L. M. Santos et al., 2010). Gran cantidad de xenobióticos incluidos los AINE's son biotransformados por el sistema Citocromo P450 (CYP450) en metabolitos activos capaces de producir ERO's a través del ciclo redox o a través del CYP450 de forma directa (Parolini & Binelli, 2012). En humanos, la familia CYP2C9 es conocida por catalizar la biotransformación de IBU por hidroxilación del compuesto padre dando lugar a metabolitos como los isómeros 1-hidroxiibuprofeno, 2-hidroxiibuprofeno y el 3-hidroxiibuprofeno (1-OH-IBU, 2-OH-IBU, 3-OH-IBU), además del carboxiibuprofeno (COOH-IBU). Autores como Gomez et al., (2011) y Jones et al., (2012) han reportado que el metabolito 2-OH-IBU resulta ser el metabolito mayormente identificado en estudios de metabolismo en peces. Solamente el 15% del compuesto padre es excretado de forma inalterada, mientras que el carboxiibuprofeno y los isómeros hidroxilados representan el 70% del total de IBU excretado (Di Baccio et al., 2017; Ferrando-Climent et al., 2012).

3.3.2 Mecanismo de acción tóxica.

Autores como Escher et al., (2005) han sugerido que los compuestos farmacéuticos tienen la capacidad de generar ERO's únicamente a través de la presencia de otros compuestos como los metales pesados o como consecuencia de la alteración a nivel mitocondrial. Durante la biotransformación de los AINE's a través de la acción de las isoformas del CYP450 en particular la CYP2C9, especies radicales como el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) y el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) son

formados al igual que metabolitos hidroxilados cuya toxicidad se observa mayor que la del compuesto padre (Blanco et al., 2005; Doi et al., 2002). Por otro lado especies radicales de nitrógeno como el peroxinitrito (ONOO-) producto de la reacción del anión superóxido con y el óxido nítrico derivado del metabolismo de la arginina, también es formado, mientras que las benzoquinonas originadas a partir de los procesos de biotransformación o la degradación abiótica de los AINE's, son moléculas altamente persistentes y electrofílicas que tienen afinidad por las biomoléculas nucleofílicas como los lípidos, proteínas y ADN (Doi et al., 2002; Oviedo-Gómez et al., 2010). Otros compuestos generados a partir de la Fase II de biotransformación de los AINE's como los metabolitos acil-glucurónidos altamente reactivos son capaces de formar aductos con centros nucleofílicos como son el ADN dañando su estructura y función (Gómez-Oliván, Galar-Martínez, et al., 2014a).

Se ha comprobado que las prostaglandinas (PG's) se encuentran fuertemente relacionadas con la regulación de la Na⁺/K⁺-ATPasa en mamíferos y en peces su actividad se ha vinculado a la osmorregulación en branquias (Choe et al., 2006; Evans et al., 2005). La alteración en la regulación iónica inducida por la presencia de IBU, puede ser generada a partir de la inhibición de la ruta de síntesis de las PG's, las cuales pueden modular tanto la producción de cortisol como la activación de la bomba de Na⁺/K⁺ (Gravel et al., 2009).

3.3.3 Ocurrencia.

Se ha reportado que el grupo terapéutico de los AINE's en específico, comprende cerca del 15% de los fármacos detectados en programas de monitoreo ambiental alrededor del mundo (L. H. M. Santos et al., 2010). Fármacos ampliamente consumidos como el diclofenaco (DCF), ibuprofeno (IBU) y paracetamol (PCM) han sido clasificados como tres de las drogas mayormente detectadas en los ecosistemas acuáticos encontrándose comúnmente en un rango de $\mu\text{g L}^{-1}$ en

muestras tomadas durante el tratamiento de aguas residuales, mientras que en aguas superficiales sus concentraciones se encuentran principalmente en el rango de los ng L^{-1} (Brausch et al., 2012; L. H. M. L. M. Santos et al., 2010)

El IBU se ha detectado ampliamente en aguas naturales y potables, así como en muestras de aguas residuales en todo el mundo. Fue encontrado en aguas de efluentes municipales y marinas en Noruega a concentraciones de $0.1\text{-}20 \mu\text{g L}^{-1}$ (Weigel et al., 2004), mientras que en el Río Turia, España fue detectado en aguas superficiales y sedimento en concentraciones de $0.18\text{-}7.20 \mu\text{g L}^{-1}$ (Carmona et al., 2014). En Sudáfrica, Madikizela & Chimuka, (2017) informaron sobre la presencia de residuos de IBU en muestras de aguas residuales y ríos, encontrando concentraciones de 5.1 hasta $72 \mu\text{g L}^{-1}$ y 4.8 a $11 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente. González-Alonso et al., (2017) estudiaron la ocurrencia de diferentes productos farmacéuticos en la Península Antártica encontrando concentraciones de 0.037 hasta $10.05 \mu\text{g L}^{-1}$ de IBU luego de muestrear descargas de aguas residuales y naturales al mar. Un estudio de la presencia de AINE's en diferentes lugares de la cuenca del Elba mostró que la IBU era el fármaco más abundante en todos los cursos de agua con una concentración máxima de $3,2 \mu\text{g L}^{-1}$ (Marsik et al., 2017).

3.3.4 Estudios de toxicidad.

La toxicidad exhibida por el IBU en los organismos de agua dulce ha sido bien documentada. Hemocitos de *Dreissena polymorpha* revelaron fragmentación de ADN y aumento en el porcentaje de células apoptóticas después de haber sido expuestas a dosis de $450\text{-}909 \mu\text{g L}^{-1}$ de ibuprofeno (Parolini et al., 2011a). Matozzo et al., (2012) reportaron que *Ruditapes philippinarum*, exhibió alteraciones significativas a nivel inmunológico después de 7 días de exposición al fármaco a concentraciones de $500\text{-}1000 \mu\text{g L}^{-1}$. La exposición de *D. rerio* a concentraciones sub-letales de ibuprofeno de $0,0001, 0,05, 1, 8$ y 25mg L^{-1} mostró un aumento en la actividad de las enzimas

antioxidantes y de biotransformación glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa acompañado de un aumento significativo en la peroxidación lipídica (Bartoskova et al., 2013). (Gómez-Oliván, Galar-Martínez, et al., 2014a) estudiaron a *Daphnia magna* encontrando alteraciones significativas en biomarcadores bioquímicos como la peroxidación de lípidos, contenido de proteínas carboniladas, actividad de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (GPx), así como daño a ADN a una concentración de 0.017 mg L⁻¹ de IBU. Además, este fármaco fue capaz de inducir la producción de radicales libres, estrés oxidativo y citotoxicidad en diferentes tejidos de la carpa común (*C. carpio*) (Islas-Flores et al., 2017a). Xia et al., (2017) encontraron que los AINE's, especialmente el IBU, afectaron significativamente la locomotividad y actuaron como potentes neurotóxicos para embriones en desarrollo de pez cebra cuando se exponen a 5, 50 y 500 µg L⁻¹ a 6 hpf. Más recientemente, (Grzesiuk et al., 2020) revelaron que la exposición crónica a 4 µg L⁻¹ de ibuprofeno causó deformidades morfológicas letales en embriones en desarrollo y especímenes juveniles de *Daphnia magna*, aunque los marcadores moleculares y los parámetros del ciclo de vida de dos generaciones diferentes evaluadas no mostraron cambios significativos. En ese mismo sentido, Gutiérrez-Noya et al., (2020) encontraron que IBU a concentraciones ambientalmente relevantes (1.5-11.5 µg L⁻¹) es capaz de inducir importantes trastornos al desarrollo embrionario y teratogenicidad en ovocitos de *C. carpio*.

3.4 Biomarcadores.

Uno de los métodos más ampliamente utilizados para la identificación y cuantificación de la exposición a compuestos contaminantes y su impacto en los organismos es el monitoreo biológico a través de biomarcadores (Gil, 2000). Estos son parámetros bioquímicos, fisiológicos, morfológicos y conductuales que pueden cuantificarse en los organismos y cuya variación indica la exposición a un tóxico específico. Tanto Magnarelli, (2015) como Oost et al., (2003) clasifican a los biomarcadores de la siguiente manera:

3.4.1 Biomarcador de exposición.

En este tipo de biomarcador se lleva a cabo la detección y medición de sustancias de origen externo, metabolitos, sub-productos o los productos generados a partir de la interacción entre los xenobióticos y moléculas, células o tejidos dianas medibles en un compartimiento perteneciente a un organismo.

3.4.2 Biomarcador de efecto.

Biomarcador que muestra cambios a nivel celular, dentro de los cuales podemos encontrar la expresión alterada de enzimas y marcadores de cambios poco específicos para el agente en cuestión. Dentro de ellos podemos incluir la determinación de alteraciones bioquímicas, fisiológicas u otro tipo asociadas con una posible causa de deterioro del estado de salud o la presencia de alguna enfermedad.

3.4.3 Biomarcadores de susceptibilidad.

Biomarcadores que pueden indicar una capacidad innata o adquirida del organismo para responder a exposiciones a tóxicos específicos. Estas incluyen factores genéticos y cambios en receptores que modifican la susceptibilidad de un organismo a una exposición específica.

3.5 Estrés oxidativo.

3.5.1 Generalidades.

El estrés oxidativo (EO) es reconocido como el resultado de un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO's y ERN's respectivamente) entre los que se encuentran el radical hidroxilo, anión superóxido y el óxido nítrico y la capacidad de las moléculas antioxidantes celulares para llevar a cabo una detoxificación. Los radicales libres son moléculas de alta reactividad que generan daño oxidativo. El daño oxidativo se da a partir de la creciente

presencia de moléculas que contienen un electrón desapareado en su última capa de valencia generadas como resultado de lisis celular, fosforilación oxidativa o debido a la presencia de un exceso de iones metálicos libres (Dennery, 2007; C. Wu et al., 2017). El EO genera una alteración en ocasiones irreversible de la homeostasis celular de óxido-reducción, lo que significa la existencia de una disparidad entre las moléculas pro-oxidantes y las defensas antioxidantes intra- y extracelulares. La principal consecuencia de este desbalance homeostático es la alteración en la relación estructura-función de las principales biomoléculas que puede derivar en el deterioro de cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado (Venero, 2002).

En las células existen múltiples fuentes de especies reactivas de oxígeno dentro de las cuales se encuentran la mitocondria, la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa y la enzima óxido nítrico sintasa. La mitocondria es reconocida como la fuente primaria de ERO's durante la actividad aerobia normal. Los electrones son liberados de la cadena de transporte de electrones directamente hacia el oxígeno molecular, produciendo con ello radicales libres de corta vida media como el anión superóxido O_2^- el cuál puede ser convertido en una especie no radicalaria como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) ya sea por una reacción de dismutación espontánea o por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en la matriz mitocondrial. Por otro lado, el H_2O_2 puede convertirse en el radical hidroxilo (OH·) a partir de las reacciones de Fenton (R. X. Santos et al., 2013).

3.5.2 Efectos de EO sobre biomoléculas.

3.5.2.1 Daño a lípidos.

Durante la peroxidación lipídica, los ácidos grasos poliinsaturados reaccionan, a través de un mecanismo de reacción en cadena, con especies reactivas de oxígeno, principalmente el radical hidroxilo (OH·) y el radical peroxinitrito (ONOO·) para formar hidroperóxidos como intermediarios que posteriormente se degradan en aldehídos reactivos como MDA y 4-hidroxi-2-nonenal que

reaccionan con proteínas y bases de ADN para generar aductos (Gentile et al., 2017; Wilhelm Filho et al., 2005). Por lo tanto, la peroxidación de lípidos se considera uno de los mecanismos más dañinos por los cuales los radicales de oxígeno causan daño tisular, alteraciones estructurales de las membranas celulares, así como una función celular deteriorada que conduce a la interrupción de la función vital en los organismos acuáticos (Barata et al., 2005).

Las membranas celulares de los organismos aerobios están compuestas por una bicapa de fosfolípidos sumamente sensible a las condiciones oxidantes intracelulares y aquellas generadas a partir del contacto con compuestos endógenos, cuyo contacto puede generar la pérdida parcial o total de su estructura y función, representando una serie amenaza para su integridad. El proceso de oxidación de lípidos se genera a partir de un mecanismo de reacciones en cadena, en especial de los ácidos grasos poliinsaturados cuyo hidrógeno alílico enlazado con al carbono con una energía de enlace muy baja, presenta una mayor facilidad de abstracción por parte de las especies radicales (Valavanidis et al., 2006).

La oxidación lipídica consta de tres etapas principales (Valavanidis et al., 2006):

Iniciación: un ácido graso insaturado es atacado por un radical que extrae un átomo de hidrógeno de un grupo metileno. Este a su vez se convierte en un radical centrado al carbono que mediante un arreglo molecular que da origen a un dieno estable el cual reacciona con oxígeno molecular formando un radical peroxilo.

Propagación: el radical formado en la etapa de iniciación buscará estabilizarse generando la abstracción de un hidrógeno perteneciente a una molécula de ácido graso contiguo iniciando una reacción en cadena a través de la membrana celular.

Terminación: esta etapa resulta de la interacción de los radicales lipídicos y/o la formación de especies no radicales a partir de los radicales peroxilo. Los peróxidos lipídicos (LOOH) pueden descomponerse generando aldehídos y cetonas, especialmente malondialdehído.

3.5.2.2 Daño a proteínas.

Las ERO's generadas a partir de la oxidación de lípidos como los radicales peroxilo (ROO·) son iniciadores potenciales de la carbonilación de proteínas. Los radicales lipídicos en conjunto con los hidroperóxidos formados como productos secundarios de la lipoperoxidación, funcionan como iniciadores y potenciadores de las reacciones de oxidación de proteínas (Estévez et al., 2008) De acuerdo con Irazusta et al., 2008 la medición de los productos derivados de la reacción de las ERO's con biomoléculas es una forma indirecta pero eficaz de determinar el grado de EO generado en un organismo. Se cree que la oxidación de proteínas se genera vía reacciones en cadena de radicales libres similares a las ocurridas durante la oxidación lipídica sin embargo las rutas y efectos generados resultan más complejos en el caso de las proteínas (Hagerman et al., 2003).

Yao & Rahman, (2011) mencionan que la carbonilación de proteínas, que es la generación de grupos carbonilo reactivos como aldehídos, cetonas y metilglioxal, entre otros, mediante la acción de moléculas de radicales hidroxilo altamente reactivas que oxidan los residuos de aminoácidos o el esqueleto proteico, puede ser considerado un criterio de valoración importante del estrés oxidativo, ya que provoca modificaciones irreversibles en la estructura y pérdida de función de varias proteínas (Dalle-Donne et al., 2003; Fritz & Petersen, 2011; Stadtman & Levine, 2003).

La oxidación de proteínas es un fenómeno sumamente complejo puesto que los mecanismos y la naturaleza de los productos dependen totalmente de las proteínas iniciadoras, las proteínas objetivo y el mecanismo mediante el cual se inicia dicha oxidación.

Algunos de los potenciales iniciadores de la oxidación proteica son : (1) Especies reactivas de oxígeno, (2) pigmentos heme, (3) iones metálicos, (4) productos de oxidación lipídica, (5) Enzimas oxidasas (Yeh et al., 2000)

Las rutas específicas y la naturaleza química de los productos finales dependen de la proteína objetivo, el sistema de oxidación y la intensidad de las condiciones de oxidación (Dalle-Donne et al., 2003).

3.5.2.3 Daño a ADN.

Los aductos con ADN pueden generarse a partir de su unión con productos de lipoperoxidación como el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal (4-HNE), aumentando la posibilidad de generar mutaciones y aberraciones en la expresión génica. El daño oxidativo al ADN se genera a partir de las alteraciones funcionales o estructurales provocadas por las especies reactivas de oxígeno las bases nitrogenadas. Los principales medios de daño oxidativo a la biomolécula son la alteración reversible e irreversible de las bases las púricas y pirimídicas, así como la ruptura de la doble hélice cadena y la formación de aductos (Quiroga-Santos et al., 2021). En general el daño celular que se genera viene precedido por perturbaciones a nivel bioquímico que afectan los mecanismos o sistemas primarios de supervivencia celular. Cualquier alteración bioquímica puede generar anomalías en las células, tejidos, y órganos, cuya función se puede ver totalmente comprometida, por ejemplo, cuando la síntesis de proteínas sufre alteraciones provocadas por el deterioro en el material genético (Vindas *et al.*, 2004)

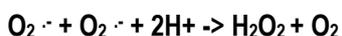
Como un proceso natural y continuo de la célula, se producen fenómenos como la conversión de bases pirimídicas a púricas, la conversión de la 5-metilcitosina en timina, pérdida de bases nitrogenadas, ruptura de hebras del ADN, entrecruzamiento de proteínas-ADN, y daño a la estructura de desoxirribosa-fosfato, sin embargo, estos fenómenos ocurren a tasas muy bajas y la célula cuenta con eficaces mecanismos de reparación (R. X. Santos et al., 2013).

La alteración más importante observada en el material genético después del ataque de una especie radical comúnmente utilizada como biomarcador de EO y genotoxicidad es la presencia

de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina y su producto de oxidación 8-oxo-2'-desoxiguanosina (Irie et al., 2003)

3.5.3 Mecanismos intracelulares de defensa antioxidante.

Se sabe que el sistema de defensa antioxidante en los teleósteos neutraliza la generación de EROS como productos de la reactividad redox de los tóxicos a través de una cascada de enzimas que eliminan los compuestos reactivos al convertirlos en moléculas menos dañinas (Gómez-Oliván, Galar-Martínez, et al., 2014a). La primera reacción enzimática realizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) conduce el mecanismo de conversión del anión superóxido (O_2^-) una molécula altamente reactiva y pro-oxidante en compuestos menos reactivos, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno diatómico. Dos isoformas de SOD están presentes en diferentes compartimentos celulares, CuZnSOD presente en el citosol y MnSOD ubicado en la matriz mitocondrial (Rodríguez et al., 2004). El zinc actúa como un estabilizador de la enzima y en su variedad mitocondrial contiene manganeso en el sitio activo.



Reacción de superóxido dismutasa

El producto de la reacción es el peróxido de hidrógeno, compuesto que resulta ser extremadamente tóxico para la célula (Yan & Spaulding, 2020)

CAT se considera una segunda línea de defensa contra ROS que reduce H_2O_2 , una molécula no radical, en H_2O y O_2 . El H_2O_2 es considerado un oxidante fuerte y potencialmente dañino que reacciona de forma casi inmediata con la enzima catalasa (Kaushal et al., 2018). Esta enzima localizada en los peroxisomas ejerce una doble función, la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua H_2O y oxígeno O_2 , y la oxidación de donadores de protones como metanol, fenoles, entre otros. La enzima contiene hematina la cual hace más fácil la detoxificación del

peróxido de hidrógeno H_2O_2 en subproductos no dañinos para la célula (Nandi et al., 2019; Valko et al., 2005)

Por otro lado, la enzima glutatión peroxidasa GPx también detoxifica el H_2O_2 y los hidroperóxidos orgánicos en especies menos reactivas. Se han identificado dos GPx en diferentes tejidos animales, el primero es una enzima dependiente de Se que reduce el H_2O_2 y los hidroperóxidos orgánicos y el segundo es una enzima independiente del Se que reduce solo los hidroperóxidos orgánicos (Barata et al., 2005). La defensa antioxidante está regulada por varios factores. El factor principal que regula la expresión génica y la actividad desintoxicante es el estado oxidativo de la célula, ya que las moléculas pro-oxidantes alteran el equilibrio oxidativo celular y la expresión génica antioxidante (Esparza et al., 2011).

3.6 Embriotoxicidad y teratogénesis.

3.6.1 Generalidades.

La embriotoxicidad y la teratogénesis son considerados efectos sub-letales que proveen de importante información sobre el estado de salud de los ecosistemas. Junto con la genotoxicidad, estos dos efectos son causados por un evento mutagénico, el cual tiene lugar cuando se genera una alteración en los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis celular con consecuencias observables desde las primeras etapas del desarrollo. Estos eventos mutagénicos y las malformaciones derivadas se observan a menudo como una consecuencia de la exposición a compuestos nocivos que inicia durante la morfogénesis temprana (Álvarez Garzón, 2011; Pašková et al., 2011).

La embriotoxicidad es entendida como la capacidad que posee un compuesto para producir un efecto nocivo en la progenie desde la embriogénesis temprana hasta la etapa fetal. Dentro de

estos efectos se pueden encontrar alteraciones morfológicas, conductuales, funcionales e incluso la muerte (Ganesan et al., 2016; Mora et al., 2015).

La teratogenicidad es considerada parte de los efectos de embriotoxicidad observada a partir de las malformaciones producidas por la exposición a xenobióticos que inician durante la embriogénesis y en ocasiones permanecen hasta la muerte del individuo. Los compuestos teratogénicos, son aquellos que generan una interferencia en los procesos de organogénesis y la formación de tejidos (Peña Hernández, 2008). (Hermsen et al., 2011) ha desarrollado un sistema de evaluación basado en puntos asignados a una serie de características observables durante el desarrollo normal de pez cebra a distintos tiempos post-fertilización, entre las que se encuentran: desplegamiento de la cola, formación de somitas, desarrollo de ojos, movimiento, latido cardíaco, circulación sanguínea, pigmentación cabeza-cuerpo, pigmentación de la cola, aparición de la aleta pectoral, protuberancia bucal y eclosión. Este sistema de evaluación tiene como finalidad contribuir al establecimiento de los valores del índice teratogénico (IT), que como su nombre lo indica es un valor que permite predecir el potencial teratogénico o de malformaciones de un compuesto en particular. Este IT se calcula a partir del cociente de CL_{50}/CE_{50} , sin embargo al tratarse de una medición cuantitativa, la severidad de las malformaciones no se toma en cuenta para determinar el potencial teratogénico de una sustancia lo cual si es posible con una escala de evaluación general de la morfología (Brannen et al., 2010; Selderslaghs et al., 2009; Ton et al., 2006). Un $IT > 1$ indica que una sustancia posee un carácter teratogénico, mientras que un $IT < 1$ indica un efecto de letalidad (Hermsen et al., 2011).

3.6.2 Relación del EO con la Embriotoxicidad y Teratogénesis.

El desarrollo es un proceso sumamente complejo y altamente específico que requiere de diversas etapas como la proliferación, diferenciación y apoptosis para facilitar la morfogénesis y el

funcionamiento normal del organismo. Cuando se lleva cabo la interrupción de uno o más de estos procesos o etapas, se da lugar a efectos nocivos que pueden derivar en malformaciones.

Los teratógenos potenciales pueden exhibir su efecto durante las etapas primarias de desarrollo donde el ovocito no posee la capacidad para hacer frente a la creciente generación de ERO's y los cambios en el estado redox celular. En las etapas tempranas del desarrollo, el cigoto altera su metabolismo, al pasar del ciclo de Krebs para la obtención de energía a la glucólisis durante la etapa de blastocito. Las vías anaeróbicas son utilizadas mayormente hasta las etapas de gastrulación y organogénesis temprana para la producción de energía. El metabolismo aeróbico se inicia con el desarrollo de un sistema circulatorio y la consecuente dependencia de oxígeno. Durante el metabolismo anaeróbico, se forman menos ERO's mitocondriales, por lo tanto, el ambiente celular es altamente reductor (etapa de proliferación). A medida que continúa el desarrollo y se produce la organogénesis, el embrión vuelve a obtener energía a partir del ciclo de Krebs con el objetivo de satisfacer la exigencia de energía y la maduración de la mitocondria. Como anteriormente se mencionó, la fosforilación oxidativa produce ERO's de forma natural, lo que sugiere el cambio un ambiente más oxidativo (etapa de diferenciación). La transición de un metabolismo mayormente anaeróbico a un metabolismo aeróbico es la etapa en la cuál se tiene una mayor susceptibilidad embrionaria a los compuestos pro-teratógenos. Durante la organogénesis temprana los embriones poseen niveles relativamente bajos de actividad enzimática antioxidante, pero aumentan a medida que continúa el desarrollo (Hansen et al., 2018) Los cambios en el estado redox durante la etapa de organogénesis temprana puede generar: (a) alteración, disminución o cese de la proliferación y la promoción de la apoptosis; y (b) períodos más largos de desequilibrio oxidativo al tener sistemas antioxidantes inmaduros, alterando con ello la señalización redox (Hansen, 2006).

3.7 Bioindicadores.

3.7.1 Generalidades.

Un bioindicador es un organismo con una sensibilidad o cierto grado de tolerancia a los compuestos contaminantes del cual es posible llevar a cabo la observación de sus respuestas biológicas frente a una perturbación ambiental y están referidos como organismos o sistemas biológicos que sirven para evaluar variaciones en la calidad ambiental. El empleo de bioindicadores se enfoca no sólo a medir la salud del sistema acuático, sino también para determinar el impacto potencial al ámbito (Bonanno & Orlando-Bonaca, 2018; Khatri & Tyagi, 2015). Los cambios en la composición química de los ambientes acuáticos naturales pueden afectar a los organismos no-objetivo, particularmente los peces teleósteos. Estos organismos son constantemente utilizados para la evaluación del estado de salud de los ambientes acuáticos, empleándose por lo general especies de importancia económica, amplia distribución geográfica e importancia biológica (López-portillo, 2019).

3.7.2 Pez cebra *Danio rerio*.

Los cambios en la composición química de los ambientes acuáticos naturales pueden afectar a los organismos no-objetivo, es por ello que los peces teleósteos han sido ampliamente utilizados para evaluar la calidad de los ambientes acuáticos como bioindicadores de contaminantes en el medio ambiente. Las especies más utilizadas para evaluar la toxicidad ambiental incluyen pequeños peces como *Pimephales promelas*, *Oryzias latipes* y *Danio rerio* hasta especies grandes como trucha arcoíris, salmón y pez gato (Zhang et al., 2003). Pez cebra (*Danio rerio*) es un miembro de la familia *Cyprinidae* originaria del sur de Asia. Prefieren el agua cálida, sin embargo pueden habitar en varios ambientes. Pez cebra ha sido utilizado desde los años 30's como organismo modelo para biología, toxicología y recientemente para la farmacología experimental. Son

organismos de fácil crianza y mantenimiento económico, los adultos llegan a medir de 4 a 5 cm de longitud alcanzando su madurez sexual a los 3-4 meses de edad. Cada hembra tiene la capacidad de depositar de 200 a 300 huevos por semana, su desarrollo se lleva a cabo de manera acelerada, la embriogénesis está completa 5 días post-fertilización (Spitsbergen & Kent, 2003; Zhang et al., 2003). El pez cebra (*Danio rerio*) se considera un modelo animal adecuado para la evaluación del riesgo ambiental asociado con contaminantes acuáticos (Scholz et al., 2008)

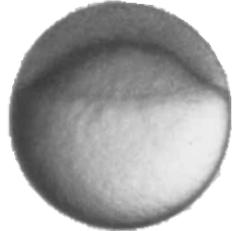
Tabla 1. Ventajas y desventajas del uso de *D. rerio* en estudios de toxicidad (Hill et al., 2005; Kari et al., 2007):

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Facilidad de mantenimiento y alta sensibilidad a compuestos xenobióticos. • Exhibe una gran similitud con los mamíferos • Fertilización y desarrollo ocurren de manera externa permitiendo observación • Rápida embriogénesis (5 días) • Embriones transparentes • Embriones son permeables a moléculas pequeñas, las moléculas grandes o lipofílicas pueden ser inyectadas. • Debido a su tamaño las muestras de estudio son pequeñas • Su secuencia genómica se encuentra estudiada casi por completo • Los métodos y las guías de estudios de toxicidad están bien establecidos en Europa. 	<ul style="list-style-type: none"> • Su uso en estudios de toxicidad no se encuentra regulado por agencias en USA. • Su fisiología se encuentra menos caracterizada que la de los mamíferos

3.7.3 Desarrollo de *Danio rerio*.

Según (Kimmel et al., 1995) el desarrollo de *D. rerio* se divide en 8 etapas principales:

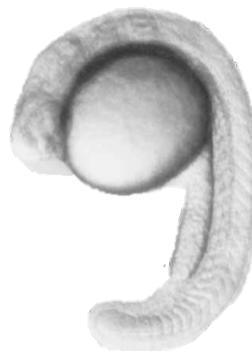
Tabla 2. Síntesis de las etapas de desarrollo de *Danio rerio*.

Periodo	Características	Imágenes representativas de cada etapa
Cigoto (0-3/4 h)	<ul style="list-style-type: none"> • Inicia poco tiempo después de la fertilización hasta la etapa de esfera en el cual se puede observar la proliferación celular en el polo animal. 	
Hendidura (3/4-2.1/4 h)	<ul style="list-style-type: none"> • Inicia en domo hasta estadio de escudo • Formación de hasta 6 blastómeros • Divisiones cada 15 minutos • Migración de polo animal hacia los lados. 	
Blástula (2 1/4 – 5 1/4 h)	<ul style="list-style-type: none"> • Blastodiscos en forma de balón • Inicia con etapa de epíbole hasta la formación de somitas (2). • El organismo empieza a tomar forma ovalada, pudiéndose distinguir la cabeza y cola. 	
Gástrula (5 1/4-10 h)	<ul style="list-style-type: none"> • Distinción cabeza, somitas y vitelio • Embrión pasa de forma esférica a arriñonada 	

Segmentación

(10-24 h)

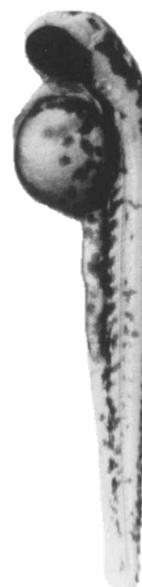
- Somitogénesis
- Observación de órganos rudimentarios
- Elongación de cola y separación del vitelo.
- Aparecen primero movimientos
- Ensanchamiento posterior (formación de estructuras primarias del SNC)
- Diferenciación de la notocorda
- Contracciones musculares débiles.



Faríngrula

(24-48 h)

- Somitas totalmente formadas
- Estructura primaria de los arcos faríngeos
- Formación de sistema digestivo
- Diferenciación de células pigmentarias (ionóforos y xantóforos)
- Notocorda bien desarrollada
- Cabeza se endereza
- Inicia formación de aletas
- Formación del sistema circulatorio
- El corazón es visible
- Aparece la sensibilidad táctil.



Eclosión

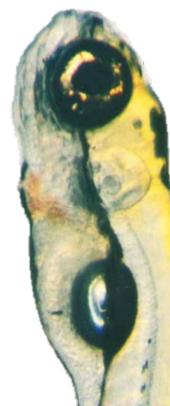
(48-72 h)

- Morfogénesis de la mayoría de los órganos rudimentarios está completa
- Continúa desarrollo de aletas pectorales
- Se observa la protuberancia bucal
- El saco vitelino tiene el mismo tamaño de la cabeza
- Se observan las estructuras primarias de la vesícula ótica
- Línea dorsal de melanóforos bien definida
- Latido cardíaco vigoroso
- Células cartilaginosas se observan en los arcos branquiales.



**Larva
temprana**

- Vesícula natatoria
- Desarrollo completo de la protuberancia bucal
- Aparición de iridióforos en la parte central del cuerpo
- El saco vitelino se encuentra casi vacío
- Nado activo
- Movimiento de mandíbula, solapas operculares, aletas pectorales y ojos
- Respuesta a estímulos externos



4. Justificación.

En los últimos años, a medida que aumentan las actividades antropogénicas, ha existido un creciente interés en los efectos de las mezclas multi-componente de diferentes clases de contaminantes químicos convencionales y emergentes, como contaminantes orgánicos persistentes, metales pesados, productos de cuidado personal y compuestos farmacéuticos, entre otros, sobre la salud humana y sobre el medio ambiente. Las autoridades regulatorias de todo el mundo se han basado principalmente en la evaluación de riesgos de formas químicas aisladas sin tener en cuenta el impacto de cócteles químicos complejos, aún cuando estudios recientes han demostrado que esas combinaciones podrían representar un peligro mayor para la biocenosis.

Actualmente se observan una gran cantidad de investigaciones científicas enfocadas en la evaluación de la ocurrencia de ingredientes farmacéuticos activos (API's) en los ecosistemas. Sin embargo, los efectos potenciales derivados de la presencia de API's en organismos no diana genera una gran incertidumbre debido a sus mecanismos de acción, reactividad y potencial de bioconcentración. El IBU es uno de los API's que se encuentra con mayor frecuencia en aguas superficiales alrededor del mundo. Estudios señalan que la presencia de IBU puede inducir efectos

tóxicos en diferentes organismos acuáticos, así como daño a nivel renal, reproductivo, de desarrollo y neurotóxicos.

Por otro lado, la presencia de metales se ha convertido en uno de los mayores problemas a nivel mundial ya que dichos compuestos pueden estar presentes en diferentes grados en todas las fases ambientales, pudiendo experimentar transformaciones y acumulaciones en constituyentes bióticos y abióticos. Diversos estudios han demostrado que el Al se acumula en cerebro, riñón, corazón, branquias y el músculo esquelético de varias especies, produciendo con ello cambios morfológicos, disminución de la actividad enzimática, aumento de la oxidación celular y alteraciones a nivel de neurotransmisores en mamíferos, sin embargo su efecto tóxico determinado a través de biomarcadores de estrés oxidativo, embriotalidad y efectos teratogénicos y las interacciones con otros compuestos como el IBU en bioindicadores acuáticos como *D. rerio* no ha sido estudiado.

Es por ello por lo que esta investigación tiene por objetivo evaluar el potencial tóxico del Al, IBU y la mezcla de ambos a través de biomarcadores de estrés oxidativo, embriotoxicidad y efectos teratogénicos para con ello contribuir a ampliar el conocimiento sobre los efectos biológicos de contaminantes y sus interacciones en matrices acuáticas en bioindicadores como *D. rerio*.

5. Hipótesis.

La exposición a formas aisladas de IBU, Al y la mezcla binaria inducirán EO en juveniles, así como embriotoxicidad y teratogénesis en embriones de *D. rerio*.

6. Objetivos.

6.1 Objetivo general.

- Evaluar la toxicidad inducida por la mezcla Al- IBP en juveniles y embriones pez cebra *D. rerio*.

6.2 Objetivos específicos.

- Determinar biomarcadores de oxidación celular así como de actividad antioxidante en órganos de pez cebra expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de Al, IBU y la mezcla binaria.
- Evaluar la embriotoxicidad inducida por IBU, Al y la mezcla binaria en *D. rerio*.
- Determinar el índice teratogénico (CL₅₀/CE₅₀)
- Identificar y cuantificar las malformaciones inducidas por IBU, Al y la mezcla binaria en embriones de pez cebra *D. rerio*
- Realizar la evaluación general de la morfología de embriones de pez cebra expuestos a Al, IBU y la mezcla binaria.

7. Metodología.

7.1 Estudio de toxicidad en juveniles.

7.1.1 Materiales y reactivos.

Se prepararon soluciones madre de aluminio (1 g L⁻¹) con Cloruro de Aluminio anhidro (AlCl₃) ReagentPlus® Número CAS 7446-70-0 > 99,9% de pureza en agua deionizada, pH 6,0 ± 0,3 y 3 h de envejecimiento. Sin filtración de soluciones madre antes de la exposición (EPA, 2017). Para un control, Al y mezclas, el pH se ajustó a 6,0 ± 0,3 con HCl 0,1 M de acuerdo con (Cardwell et al., 2018a). Se prepararon soluciones madre de IBU (1 g L⁻¹) con ibuprofeno (≥98%) número CAS 15687-27-1. Las soluciones madre se prepararon con agua deionizada. Para un control y tanques

de prueba IBU, el agua mantuvo las mismas características de los tanques de aclimatación. A menos que se indique lo contrario, los reactivos fueron proporcionados por Sigma-Aldrich, St Louis.

7.1.2 Mantenimiento de especímenes de *D. rerio*.

Se adquirieron especímenes de pez cebra de tres meses de edad ($0,89 \pm 0,3$ g y $3,52 \pm 0,05$ cm de longitud) de un proveedor comercial y se mantuvieron en un período de aclimatación de 15 días antes de los experimentos. Los peces se mantuvieron en recipientes de 120 L con agua del grifo declorada a 26 ± 2 ° C, pH entre 7.2-7.6, saturación de oxígeno superior al 60% y fotoperiodos naturales de 12 h de oscuridad y 12 h de luz. Los organismos se alimentaron dos veces al día con alimento comercial en hojuelas (Tetramin Flake) dos veces al día de acuerdo con las metodologías propuestas por (Ferdin & Halili, 2017); (Senger et al., 2011) y recomendaciones citadas en las directrices de la OCDE (Guideline et al., 2009; OECD, 2013).

7.1.3 Ensayos de toxicidad.

Las pruebas de toxicidad con renovación de medio consistieron en recipientes de vidrio de 25 L en condiciones de laboratorio. Los parámetros del agua se mantuvieron constantes: dureza de 120 ± 20 mg / L CaCO_3 según (Griffitt et al., 2008), pH que varía entre 6.0-6.3 para tanques de prueba que contienen Al (aislado y mezclas) y 7.2 para tanques que contienen IBU aislado, saturación de oxígeno por encima del 60% y temperatura constante de 26 ± 2 ° C (OCDE, 2009). Los organismos se alimentaron dos veces al día (Ferdin & Halili, 2017) y se renovó el agua cada 48 h con limpieza normal. Se realizaron dos pruebas de control.

7.1.3.1 Ensayo de toxicidad con Aluminio.

Las soluciones madre se prepararon con cloruro de aluminio anhidro (AlCl_3) ReagentPlus® Número CAS 7446-70-0 > 99,9% de pureza en agua deionizada con un pH que oscila entre 6,0-6,3 y un período de envejecimiento de 3 h después de mezclar las soluciones madre con el agua

de los sistemas de prueba. No se realizó ninguna filtración de las soluciones madre antes de la exposición. Se utilizaron concentraciones nominales de 0.05 mg L⁻¹ y 6 mg L⁻¹ según la concentración máxima permitida para la protección de la vida acuática por las autoridades reguladoras mexicanas (SEDUE, 1989) y una concentración ambientalmente relevante respectivamente (González-González et al., 2014a). Para un control, el agua de los tanques de prueba de Al y las mezclas de Al-IBU se acidificó a un pH que oscilaba entre 6,0 y 6,3 con ácido clorhídrico diluido (HCl 0,1 M) según (Cardwell et al., 2018a).

7.1.3.2 Ensayo de toxicidad con Ibuprofeno.

Se prepararon soluciones madre con ibuprofeno IBU C₁₃H₁₈O₂ (número CAS 15687-27-1, pureza > 98%). Se disolvió IBU en agua deionizada para preparar las soluciones madre. Se utilizaron concentraciones de 0.01 µg L⁻¹ y 11 µg L⁻¹ como ambientalmente relevantes (Félix-Cañedo et al., 2013; Madikizela & Chimuka, 2017). Para un control y tanques de prueba de IBU, el agua de prueba mantuvo las mismas características del agua de aclimatación.

7.1.3.3 Diseño experimental.

El experimento se realizó en siete grupos para cada tiempo de exposición (7, 14, 21 y 28 días), se utilizaron un total de veinticinco individuos para cada ensayo.

Grupo- 1: Grupo de control

Grupo 2: D. rerio expuesta a 0.05 mg L⁻¹ de Al

Grupo 3: D. rerio expuesto a 6 mg L⁻¹ de Al

Grupo 4: D. rerio expuesta a 0,1 µg L⁻¹ de IBU

Grupo 5: D. rerio expuesta a 11 µg L⁻¹ de IBU

Grupo 6: D. rerio expuesta a la mezcla 1 (M1) 0,1 µg L⁻¹ de IBU + 0,05 mg L⁻¹ de Al

Grupo- 7: D. rerio expuesta a la mezcla 2 (M2) 11 µg L⁻¹ de IBU + 6 mg L⁻¹ de Al

Debido a la presencia de Al, todas las mezclas de agua de los tanques de prueba se acidificaron a un pH que oscilaba entre 6,0 y 6,3 con ácido clorhídrico diluido (HCl 0,1 M) según Cardwell et al., (2018).

7.2 Determinación del estrés oxidativo inducido por compuestos individuales y mezclas binarias.

Al final de los ensayos, los organismos fueron anestesiados en hielo hasta la muerte y se extrajeron los tejidos del cerebro, las branquias, el hígado y el intestino después de cada período específico de 7, 14, 21 y 28 días. Los órganos se suspendieron en 500 µl de buffer de fosfatos pH 7,4, se homogeneizaron, se centrifugaron a 12.500 X g a una temperatura de -4 ° C durante 15 min y se almacenaron a -80 ° C. La extracción de órganos se llevo a cabo por triplicado para cada muestra. Posteriormente, se evaluó el siguiente biomarcador de oxidación celular: Peroxidación de lípidos (LPX). Además, también se realizaron ensayos sobre la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX).

7.2.1 Determinación de Lipoperoxidación.

La determinación de LPO se realizó utilizando el método de sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS) como lo describen Buege & Aust, (1978) con algunas modificaciones. A 25 µL de sobrenadante, se añadió solución tampón Tris-HCl pH 7,4 hasta alcanzar un volumen de 500 µL. Posteriormente, se añadieron a la mezcla 500 µl de reactivo TBA-TCA [ácido tiobarbitúrico al 0,375% (Fluka-Sigma-Aldrich, México) en solución de ácido tricloroacético al 15%] y se agitó vigorosamente. La mezcla se calentó hasta ebullición y luego se enfrió rápidamente para crear un choque térmico. El precipitado se eliminó mediante centrifugación a 3500 X g durante 10 min. Las muestras se leyeron a 535 nm frente a un blanco de reacción con el mismo tratamiento. El contenido de malondialdehído (MDA) se calculó usando el coeficiente de extinción molar (MEC)

de $1,56 \times 10^{-5} \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Los resultados se expresaron como milimol de MDA por miligramo de tejido proteico. El ensayo se realizó por triplicado.

7.2.2 Determinación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD).

La actividad de SOD fue determinada por el método de Marklund & Marklund, (1974) con modificaciones hechas por X. Li, (2012). Primero, las muestras se deslipidaron agregando 15 μL de cloroformo y 25 μL de metanol a 50 μL de suero. A continuación, los tubos de mezcla se agitaron vigorosamente durante 1 min, se centrifugaron durante 15 min a 6000 X g y se retuvo el sobrenadante. En una cubeta de cuarzo, se preparó la siguiente mezcla: se mezclaron 25 μL de muestra con 700 μL de una solución tampón Tris-HCl 0,05 M (pH 7,4) y 12,5 μL de solución Na_2EDTA 1 mM. Posteriormente, se añadieron 12,5 μL de solución de pirogallol (60 Mm en HCl 1 mM, 37°C). El blanco de reacción se preparó con el mismo tratamiento utilizando agua destilada. La absorbancia se leyó a 420 nm a intervalos de tiempo de 30 s durante 5 min. El ensayo se realizó por triplicado y la diferencia se tomó como la densidad óptica (DO) del blanco (blanco ΔDO), que representa la diferencia en las DO para la reacción no inhibida de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$|[(\text{Promedio } \Delta\text{DO}_{\text{muestra}} \times 100) / (\text{Promedio } \Delta\text{DO}_{\text{blanco}})] - 100| \times 0.6$$

Donde:

$\Delta\text{OD}_{\text{muestra}}$ = Diferencia en las densidades ópticas de las muestras

$\Delta\text{OD}_{\text{blanco}}$ = Diferencia en las densidades ópticas del blanco

7.2.3 Determinación de la actividad de catalasa (CAT).

La actividad de catalasa se realizó de acuerdo con el método de Q et al., (1991). En la curva de prueba, se preparó la siguiente mezcla: a 15 μL del sobrenadante se le añadieron 210 μL de solución buffer de aislamiento [sacarosa 0,3 M (Vetec-Sigma-Aldrich, St. Louis), 500 μL EDTA,

HEPES 5 mM y 5 KH₂PO₄ mM (Vetec- Sigma-Aldrich, St. Louis)] y 150 µL de una solución de peróxido de hidrógeno 20 mM (Vetec-Sigma-Aldrich, St. Louis). La absorbancia se leyó a 240 nm después de 0 y 60 s. Los resultados se obtuvieron utilizando la fórmula:

concentración de CAT = (ΔA) / MEC), donde:

MEC H₂O₂ = 0,043 mM⁻¹ cm⁻¹

La actividad CAT se expresó en términos de mM de H₂O₂ por miligramo de tejido proteico.

7.2.4 Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPX).

La actividad de GPX se determinó según el método propuesto por (Gonzler, 1984) y modificado por García-Medina et al., (2013). En la curva de prueba, se preparó la siguiente mezcla: 50 µL de sobrenadante, 450 µL de solución tampón de reacción pH 7,0 (K₂HPO₄ 50 mM, KH₂PO₄ 50 mM, azida sódica 1 mM, glutatión reducido 3,5 mM, glutatión reductasa 2 U y NADPH 0,12 mM) y se añadieron 100 µl de H₂O₂ 0,08 mM y se mezclaron vigorosamente. La absorbancia se leyó a 340 nm, a 0 y 60 s. La actividad se calculó usando el MEC de NADPH = 6,2 mM⁻¹cm⁻¹. La actividad de GPX se expresó en términos de mM de NADPH por miligramo de tejido proteico.

7.2.5 Determinación del contenido de proteínas totales.

El contenido de proteínas totales se realizó de acuerdo con el método de Bradford (1974). A 6,5 µL de sobrenadante de tejido se le añadieron 37,5 µL de agua deionizada y 625 µL de reactivo de Bradford (0,05 g de azul brillante Cumassie g-250, 25 mL de etanol al 96% y 50 mL de H₃PO₄ en 500 mL de agua deionizada preparada en la oscuridad a temperatura ambiente). Los tubos de ensayo se agitaron en un vórtex y se dejaron reposar durante 5 min en la oscuridad. La absorción se determinó a 595 nm. Los resultados se extrapolaron a una curva estándar elaborada con albúmina de suero bovino.

7.2.6 Análisis estadístico.

Todos los resultados se evaluaron mediante ANOVA de una vía para probar las diferencias entre los tratamientos (controles, formas aisladas y mezclas) y las diferencias entre las medias se evaluaron con una prueba de comparación múltiple de Tukey HSD ($P < 0,05$) utilizando el programa SPSS v10 (SPSS, Chicago ILLINOIS).

7.3 Estudio de embriotoxicidad y teratogénesis.

7.3.1 Materiales y reactivos.

Se prepararon soluciones madre de aluminio (100 mg L^{-1}) con cloruro de aluminio anhidro (AlCl_3) ReagentPlus® Número CAS 7446-70-0 > 99,9% de pureza en agua deionizada, $\text{pH } 6,0 \pm 0,3$ y 3 h de envejecimiento. Sin filtración de soluciones madre antes de la exposición (EPA, 2017). Por otro lado, se prepararon soluciones madre de IBU (100 mg L^{-1}) con ibuprofeno ($\geq 98\%$) número CAS 15687-27-1. Las soluciones madre se prepararon con agua deionizada. A menos que se indique lo contrario, los reactivos fueron proporcionados por Sigma-Aldrich, St Louis.

7.3.2 Mantenimiento de progenitores.

Se adquirieron especímenes sanos de pez cebra de tipo salvaje en madurez sexual ($0,89 \pm 0,3 \text{ gy}$ $3,52 \pm 0,5 \text{ cm}$ de longitud) de un proveedor comercial y se mantuvieron en un período de aclimatación de 30 días antes de los experimentos. Los peces fueron sexados y mantenidos en recipientes de 50 L con agua corriente de clorada a $26 \pm 2 \text{ }^\circ \text{C}$, pH entre 7.2-7.6, saturación de oxígeno superior al 60% y fotoperiodos naturales de 12 h de oscuridad y 12 h de luz. Los progenitores se alimentaron con alimento en hojuelas dos veces al día según las metodologías seguidas por (Ferdin & Halili, 2017; Guidelines et al., 2013; Senger et al., 2011) Una semana antes del desove, los ejemplares se alimentaron exclusivamente con *Artemia* sp.

7.3.3 Recolección de ovocitos.

Las hembras y los machos (2: 1) se colocaron en tres recipientes de desove individuales de 10 L con agua del grifo de clorada reconstituida con sales comerciales (1 mL / L) a 27 ± 1 ° C. Para evitar la depredación, se colocaron cajas de malla dentro de las maternidades. Los ovocitos recolectados se seleccionaron al azar y se observaron bajo un microscopio estereoscópico (Zeiss Stemi 305) para separar huevos viables y no viables. Solo se utilizaron embriones fertilizados en la etapa de blástula (Kimmel et al., 1995).

7.3.4 Ensayos de toxicidad de compuestos aislados.

La exposición se llevó a cabo siguiendo las Directrices de la OCDE para las pruebas de sustancias químicas: Prueba de toxicidad en embriones de pez (FET) (OECD, 2013) con algunas modificaciones. Los ovocitos viables se expusieron a 0.1, 0.5, 1,3,5,7,9,11, 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 0.01,0.05, 0.1, 1,2,4,6,8 mg L^{-1} de ibuprofeno y aluminio, respectivamente. Para ambas sustancias, se seleccionaron concentraciones ambientalmente relevantes en varios cuerpos de agua (González-González et al., 2014a; Madikizela & Chimuka, 2017; Millecam et al., 2019). Se utilizaron un total de 20 ovocitos para cada concentración y sistemas de control. Todas las pruebas se llevaron a cabo por triplicado. Los embriones se colocaron en placas con 24 pocillos con 2 mL de medio reconstituido que contenía diferentes concentraciones de IBU y Al y se mantuvieron en una incubadora por 96 h a una temperatura controlada de 27 ± 0.5 ° C. Las observaciones se realizaron con el microscopio estereoscópico a las 12, 24, 48, 72 y 96 hpf. La determinación de embrioletalidad y efectos teratogénicos se realizó a las 96 hpf. Se consideró como letalidad la coagulación de los ovocitos y/o la falta de latido cardíaco.

7.3.4.1 Determinación de CL₅₀, CE₅₀ e Índice Teratogénico (IT).

Después de 96 hpf, se cuantificaron los embriones vivos, muertos y malformados, y se utilizó un análisis de regresión lineal PROBIT para calcular los valores de Concentración Letal 50 y Concentración Efectiva 50 ($p < 0,05$). El índice teratogénico (TI) tanto del ibuprofeno como del aluminio se calculó de acuerdo con el cociente entre LC₅₀ / EC₅₀ (Weigt et al., 2011).

7.3.5 Ensayos de toxicidad de la mezcla binaria.

Para evaluar la letalidad y las alteraciones teratogénicas inducidas por la mezcla de IBU y Al, se expusieron ovocitos a concentraciones nominales de ambos tóxicos iguales a los valores de CE₅₀ obtenidos para las formas aisladas (8.06 $\mu\text{g L}^{-1}$ de IBU y 5.0 mg L^{-1} de Al). Posteriormente se realizó la metodología de mantenimiento y análisis como se indica en el apartado 7.3.4.

7.3.6 Evaluación del desarrollo embrionario.

Los sistemas mencionados en las secciones 2.4 y 2.5 se utilizaron para la evaluación cualitativa y cuantitativa de las características del desarrollo y los efectos teratogénicos de los embriones de acuerdo con su morfología visible a 12,24,48,72 y 96 hpf. Las anomalías estructurales y el desarrollo retardado se contemplaron como los principales criterios de valoración teratogénicos. Todos los embriones se compararon con los embriones de referencia presentados por Kimmel et al., 1995). Los criterios de valoración como el desarrollo de los ojos y la cola, la formación de somitas, los latidos del corazón, el movimiento de la circulación sanguínea, la pigmentación de la cabeza, el cuerpo y la cola, la apariencia de la aleta pectoral, la protuberancia de la boca y la tasa de eclosión se evaluaron según la puntuación establecida por (Hermsen et al., 2011)

7.3.7 Análisis de malformaciones y efectos teratogénicos.

La cuantificación de malformaciones y alteraciones teratogénicas se registraron en una base de datos después de 12,24,48,72 y 96 hpf. En busca de cualquier malformación visible como edema

pericárdico y ocular, malformación de cabeza, otolito, cola y corazón, estructura de notocorda modificada (escoliosis) y retraso en el proceso de eclosión (Hermesen et al., 2011), todos los organismos fueron observados bajo el microscopio estereoscópico y fotografiado para su posterior análisis. Después del examen, las muestras biológicas se eliminaron siguiendo los estándares institucionales.

7.3.8 Evaluación de la frecuencia cardíaca.

Se colocaron diez larvas por grupo de concentración (72 hpf) en placas de Petri que contenían 3% de metilcelulosa según la metodología seguida por Antkiewicz et al., (2005) y se registraron imágenes cardíacas con una cámara Zeiss AxioCam 5s. Se contaron los latidos ventriculares y auriculares en períodos de 15 s y posteriormente se calcularon los latidos por minuto. Se realizaron triplicados. Los resultados se compararon con los del grupo de control colocado en condiciones idénticas.

7.3.9 Análisis estadístico.

Los resultados de LC50 y EC50 se evaluaron mediante el análisis PROBIT (software US-EPA ver 1.5). Por otro lado, se evaluó la frecuencia de ovocitos / embriones anormales y se analizaron los efectos embriotóxicos y teratogénicos, así como la frecuencia cardíaca, mediante la prueba exacta de Fisher ($P < 0.05$) SPSS v10 (SPSS, Chicago IL). Los lotes de huevos solo se usaron cuando la tasa de fertilización fue superior al 90% y los grupos de control mostraron menos del 10% de teratogenicidad a 96 hpf (OECD, 2013).

8. Resultados.

8.1 Biomarcadores de oxidación celular y actividad antioxidante.

8.1.1 Resultados de Lipoperoxidación (LPO).

Los resultados de LPO para compuestos aislados y mezclas binarias se muestran en la Figura 1. En general, la concentración de MDA aumentó significativamente en todos los tejidos y tiempos de exposición para la Mezcla 2 con respecto al grupo no expuesto ($P < 0.05$). M1 mostró un comportamiento similar principalmente en el cerebro y las branquias en diferentes momentos de exposición. Además, la forma aislada de Al a 6 mg L^{-1} mostró aumentos significativos en las branquias, el hígado y el intestino. Se observaron valores significativamente más altos con respecto al grupo no expuesto ($P < 0.05$) para IBU ($11 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) en el hígado después de 7, 14 y 28 d. Por otro lado, los valores de MDA de las concentraciones más bajas de ambos tóxicos no cambiaron significativamente. En general, se encontraron diferencias significativas entre las formas aisladas y ambas mezclas en todos los momentos de exposición en todos los tejidos evaluados.

8.1.2 Resultados de actividad de superóxido dismutasa (SOD).

Los valores de actividad antioxidante de la enzima SOD se muestran en la Figura 3. Para las muestras expuestas a formas aisladas, no se produjeron diferencias con significación estadística en comparación con el grupo no expuesto ($P < 0,05$) para IBU o Al en las concentraciones más bajas. La actividad de SOD aumentó significativamente para la mezcla M2 en todos los tejidos en diferentes momentos de exposición en comparación con el grupo no expuesto ($P < 0,05$). En el hígado, la mayor concentración de IBU mostró una mayor actividad antioxidante a los 7, 14 y 28 d, así como en el intestino a los 14 d. Asimismo, se produjeron valores estadísticamente aumentados de actividad enzimática para M1 en branquias, hígado e intestino en diferentes

momentos de exposición. Se encontraron diferencias significativas dentro de compuestos aislados y mezclas principalmente en branquias, hígado e intestino.

8.1.3 Resultados de la actividad de catalasa (CAT).

La actividad antioxidante de la enzima CAT se muestra en la Figura 3. Para las muestras expuestas a formas aisladas en las concentraciones más bajas, no se produjeron diferencias significativas con respecto al grupo no expuesto ($P < 0,05$). Se observaron valores aumentados significativos para M1 y M2 en todos los tejidos en diferentes momentos de exposición. La actividad enzimática se incrementó significativamente con respecto al grupo no expuesto ($P < 0,05$) en branquias, hígado e intestino para Al (6 mg L^{-1}) en diferentes tiempos de exposición. La mayor concentración de IBU mostró un aumento estadísticamente significativo a los 21 d en el cerebro. En general, se observaron diferencias significativas dentro de los compuestos aislados y ambas mezclas después de todos los tiempos de exposición en todos los tejidos evaluados.

8.1.4 Resultados de la actividad de glutatión peroxidasa (GPX).

Los valores de actividad antioxidante de GPX se muestran en la Figura 4. Se produjeron diferencias significativas de actividad con respecto a las muestras no expuestas ($P < 0,05$) para M2 en todos los tejidos evaluados en varios tiempos de exposición. La actividad enzimática de M1 también aumentó en el cerebro, las branquias y el hígado. Asimismo, Al (6 mg L^{-1}) indujo la actividad en todos los tejidos evaluados con respecto al grupo control ($P < 0,05$). El IBU ($11 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) aumentó la actividad en branquias e hígado a los 21 y 28 d. Las concentraciones más bajas de IBU y Al aumentaron significativamente la actividad de GPX en branquias e intestino a los 21 y 7 días, respectivamente, en relación con el grupo control ($P < 0,05$). Se encontraron diferencias con significancia estadística entre las formas aisladas y las mezclas binarias en diferentes tiempos y tejidos.

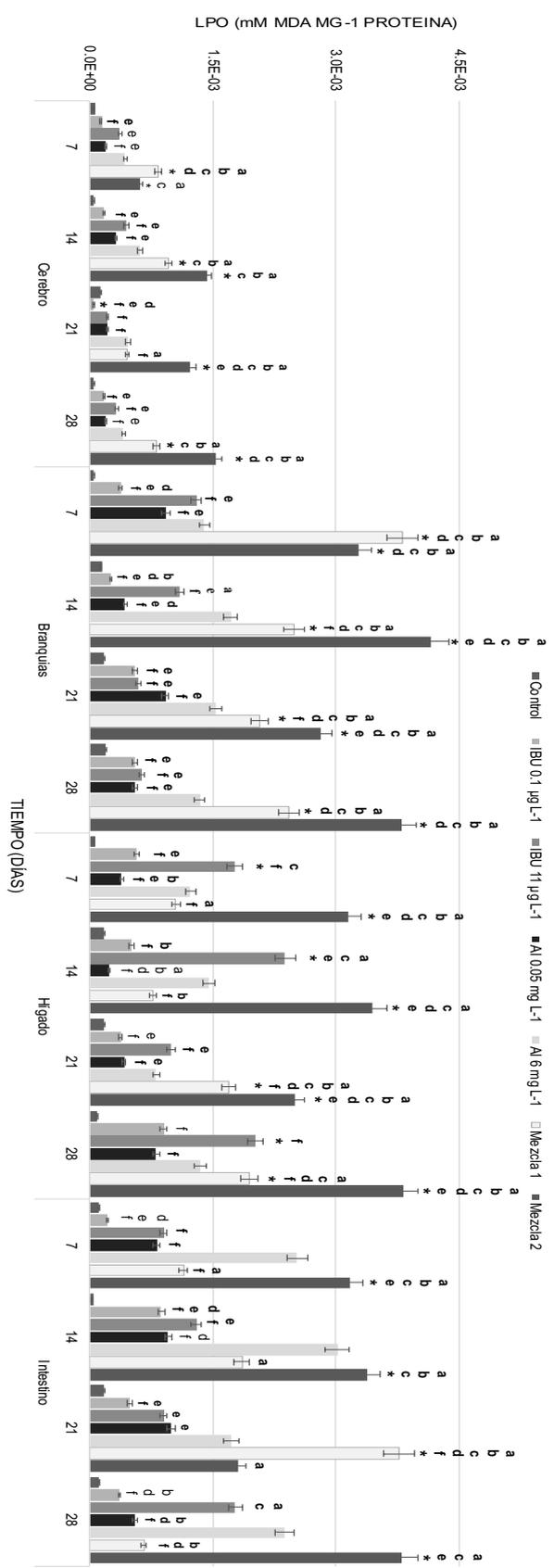


Figura 1. Determinación de LPO en cerebro, branquias, hígado e intestino de *Danio rerio* después de exposición a IBU, Al y mezclas binarias a los 7, 14, 21 y 28 días. * Valores estadísticamente diferentes con respecto al grupo no expuesto ($P < 0.05$). Las letras muestran valores estadísticamente diferentes en comparación con las muestras expuestas ^a Ibuprofeno 0,1 µg L⁻¹, ^b Ibuprofeno 11 µg L⁻¹, ^c aluminio 0,05 mg L⁻¹, ^d aluminio 6 mg L⁻¹, ^e mezcla 1 (M1), ^f mezcla 2 (M2). Prueba ANOVA y Tukey HSD.

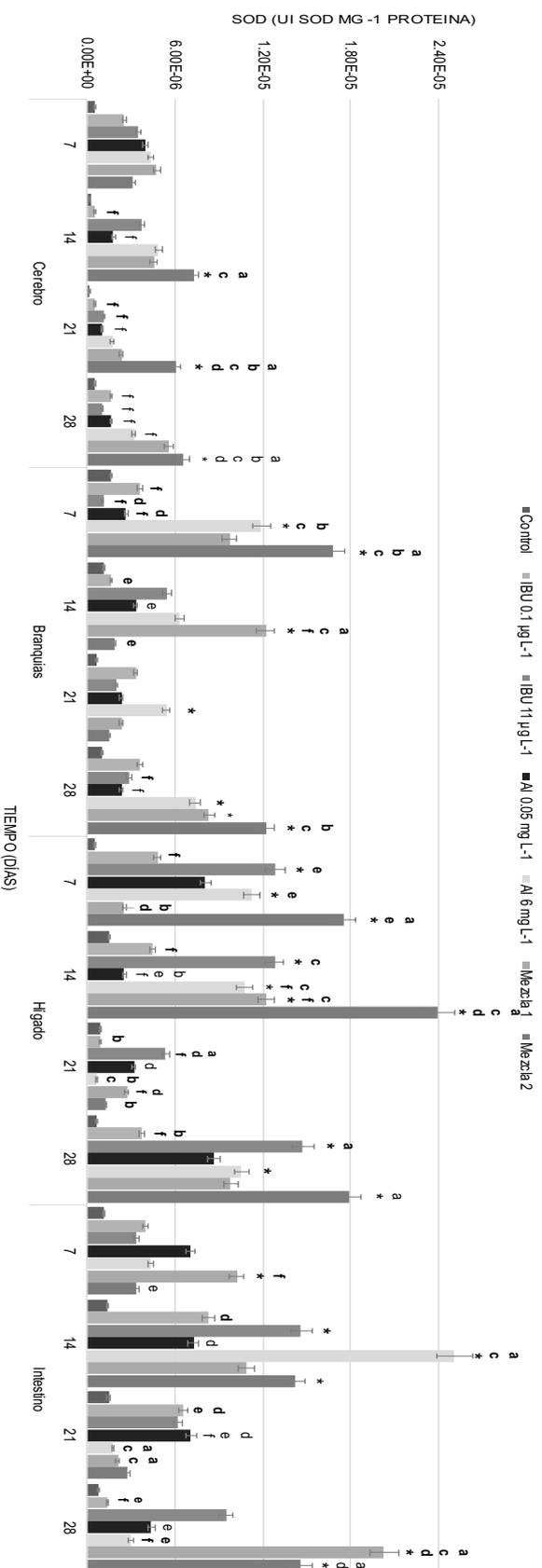


Figura 2. Actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD) en cerebro, branquias, hígado e intestino de *Danio rerio* después de la exposición a IBU, Al y mezclas binarias a los 7, 14, 21 y 28 días. * Valores estadísticamente diferentes con respecto al grupo no expuesto ($P < 0.05$). Las letras muestran valores estadísticamente diferentes en comparación con las muestras expuestas a ibuprofeno 0,1 µg L⁻¹, b ibuprofeno 11 µg L⁻¹, c aluminio 0,05 mg L⁻¹, d aluminio 6 mg L⁻¹, e mezcla 1 (M1), f mezcla 2 (M2). Prueba ANOVA y Tukey HSD.

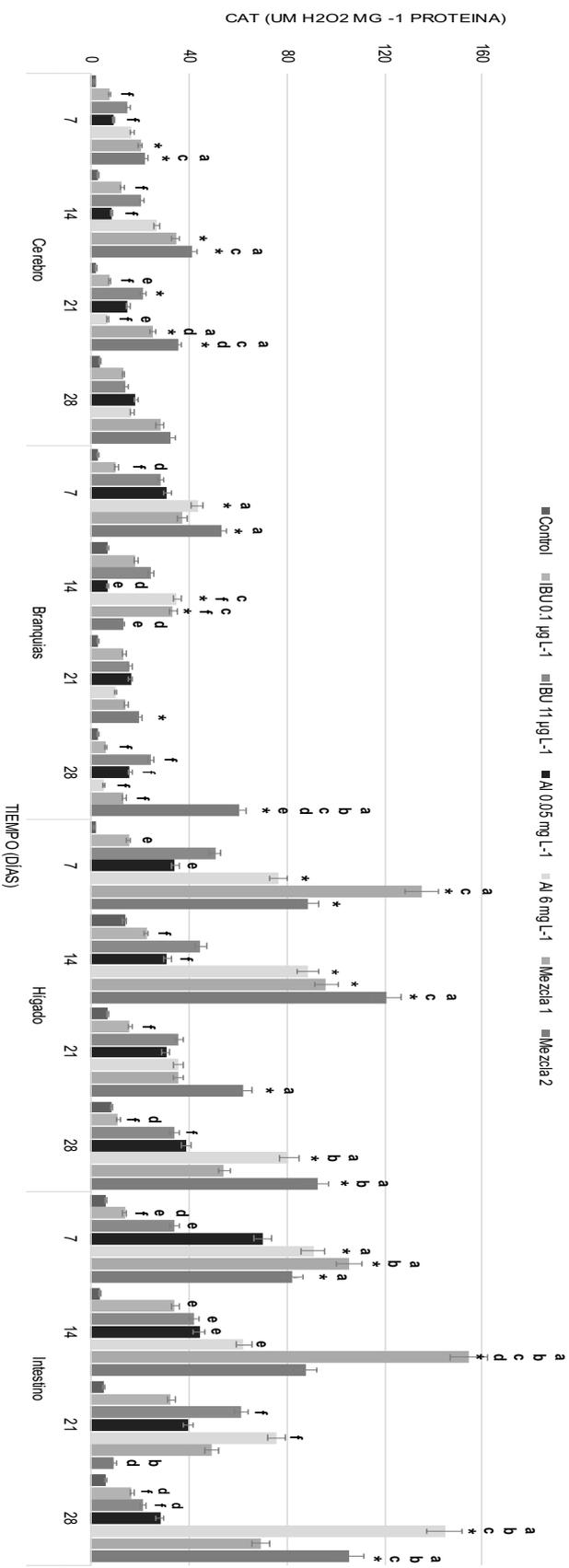


Figura 3. Actividad enzimática de la catalasa (CAT) en cerebro, branquias, hígado e intestino de *Danio rerio* después de la exposición a concentraciones de IBU, Al y mezclas binarias a los 7, 14, 21 y 28 días. * Valores estadísticamente diferentes con respecto al grupo no expuesto ($P < 0.05$). Las letras muestran valores estadísticamente diferentes en comparación con las muestras expuestas a ibuprofeno 0,1 µg L⁻¹, b ibuprofeno 11 µg L⁻¹, c aluminio 0,05 mg L⁻¹, d aluminio 6 mg L⁻¹, e mezcla 1 (M1), f mezcla 2 (M2). Prueba ANOVA y Tukey HSD.

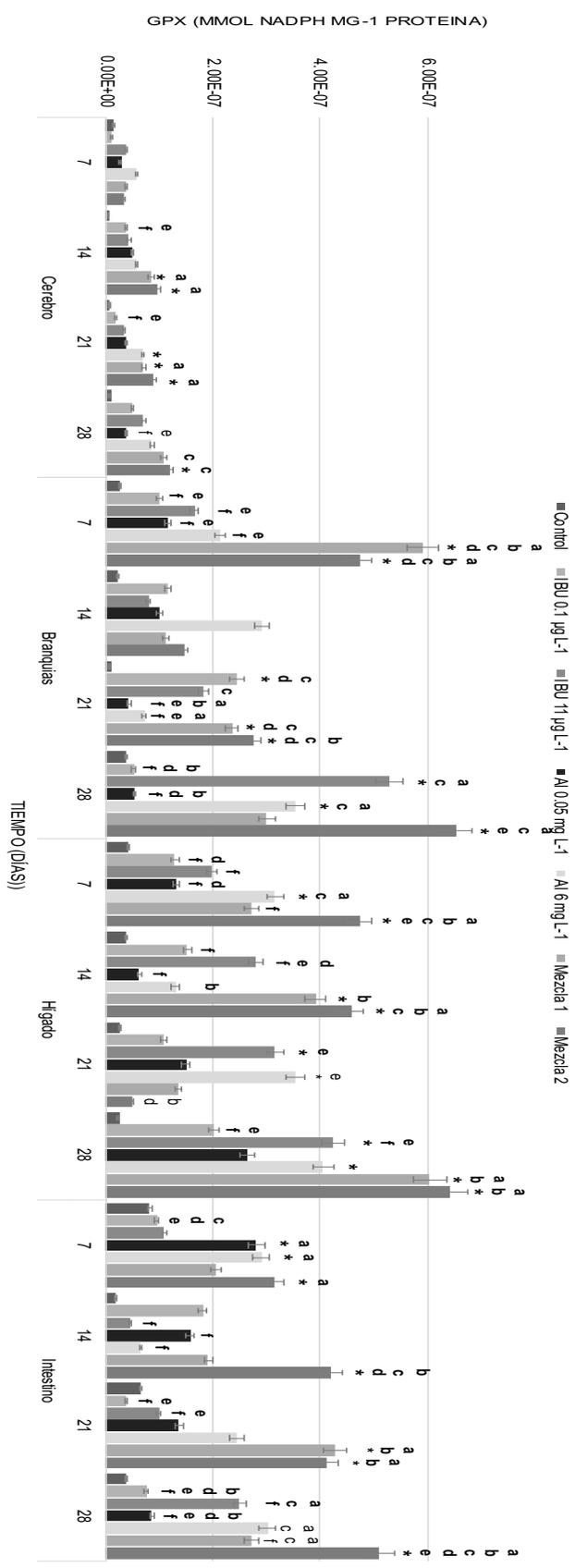


Figura 4. Actividad enzimática glutatión peroxidasa (GPX) en cerebro, branquias, hígado e intestino de *Danio rerio* después de la exposición a concentraciones de IBU, Al y mezclas binarias a los 7, 14, 21 y 28 días. * Valores estadísticamente diferentes con respecto al grupo no expuesto ($P < 0.05$). Las letras muestran valores estadísticamente diferentes en comparación con las muestras expuestas a ibuprofeno 0, 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, b ibuprofeno 11 $\mu\text{g L}^{-1}$, c aluminio 0,05 mg L^{-1} , d aluminio 6 mg L^{-1} , e mezcla 1 (M1), f mezcla 2 (M2). Prueba ANOVA y Tukey HSD.

8.1.5 Interacciones aditivas.

Tabla 3. Valores de los biomarcadores de las interacciones aditivas calculadas entre las formas aisladas de Al e IBU, y los valores reales obtenidos tras la exposición a mezclas de ambos contaminantes.

Biomarcador	Dias	Órgano	Interacción mínima aditiva	Interacción máxima aditiva	Valor real M1	Valor real M2	Biomarcador	Dias	Órgano	Interacción mínima aditiva	Interacción máxima aditiva	Valor real M1	Valor real M2
LPX (mM MDA mg⁻¹ proteína)							SOD (IU SOD mg⁻¹ proteína)						
	7	Cerebro	0.00034	0.00081	0.00084 ^a	0.00061 ^a	Cerebro	5.9E-06	7.8E-06	1.3E-06 ^{a,b}	4.2E-06 ^a		
			Branquias	0.00132	0.00106	0.00380 ^{a,b}		0.00328 ^{a,b}	1.6E-06	1.3E-05	4.6E-06 ^{a,b}	3.8E-06 ^{a,b}	
				Hígado	0.00235	0.00070		0.00105 ^{a,b}	0.00315 ^{a,b}	1.3E-05	2.4E-05	6.6E-06 ^{a,b}	1.5E-05
		Intestino	0.00105	0.00075	0.00115 ^b	0.00317 ^{a,b}	5.8E-06	7.6E-06	5.0E-06 ^a	1.2E-05 ^{a,b}			
			Cerebro	0.00052	0.00270	0.00097 ^{a,b}	0.00142 ^{a,b}	6.1E-06	8.5E-06	4.5E-06 ^{a,b}	3.8E-06 ^a		
				Branquias	0.00068	0.00281	0.00248 ^a	0.00416 ^{a,b}	7.9E-06	1.2E-05	4.4E-06 ^{a,b}	4.9E-06 ^{a,b}	
	14	Hígado	0.00075	0.00213	0.00077 ^b	0.00345 ^{a,b}	1.5E-05	2.4E-05	1.1E-05	9.3E-06			
			Intestino	0.00184	0.00198	0.00185	0.00337 ^{a,b}	1.7E-05	4.0E-05	9.1E-06 ^{a,b}	1.9E-05 ^b		
				Cerebro	0.00026	0.00070	0.00046 ^b	0.00123 ^{a,b}	3.6E-06	2.8E-06	3.7E-06	1.7E-06	
		Branquias	0.00148	0.00213	0.00207 ^a	0.00281 ^{a,b}	4.5E-06	7.4E-06	3.8E-06	5.0E-06 ^b			
			Hígado	0.00080	0.00181	0.00170 ^a	0.00250 ^{a,b}	7.8E-06	5.9E-06	1.1E-05 ^{a,b}	1.9E-05 ^{a,b}		
				Intestino	0.00148	0.00263	0.00378 ^{a,b}	0.00181 ^b	8.6E-06	7.9E-06	6.7E-06 ^a	3.7E-06 ^a	
28	Cerebro	0.00037	0.00075	0.00081 ^a	0.00154 ^{a,b}	3.5E-06	4.2E-06	2.1E-06 ^a	1.6E-06				
		Branquias	0.00111	0.00198	0.00242 ^{a,b}	0.00379 ^{a,b}	5.3E-06	1.0E-05	6.0E-06 ^b	6.2E-06 ^b			
			Hígado	0.00171	0.00337	0.00195 ^b	0.00381 ^a	1.7E-05	2.5E-05	1.3E-05	1.5E-05		
	Intestino	0.00092	0.00416	0.00066 ^{a,b}	0.00381 ^a	1.2E-05	1.2E-05	8.3E-06 ^{a,b}	4.7E-06 ^{a,b}				

CAT (umol H ₂ O ₂ mg ⁻¹ proteína)						GPX (mmol NADPH mg ⁻¹ proteína)					
7	Cerebro	23.08	46.27	9.21 ^{ab}	16.59 ^{ab}	7	Cerebro	5.0E-08	9.6E-08	7.3E-09 ^{ab}	1.9E-08 ^{ab}
	Branquias	39.16	52.54	28.13 ^{ab}	43.51		Branquias	2.7E-07	3.8E-07	1.2E-07	4.2E-07
	Hígado	66.44	71.60	34.28 ^{ab}	76.49		Hígado	3.3E-07	5.1E-07	1.6E-07 ^a	3.0E-07
14	Intestino	47.92	79.00	70.55 ^a	90.83 ^{ab}	Intestino	2.1E-07	4.0E-07	4.9E-07 ^a	5.5E-07 ^a	
	Cerebro	33.66	55.92	8.59 ^{ab}	26.92 ^b	Cerebro	8.2E-08	1.0E-07	2.1E-08 ^{ab}	7.7E-08 ^b	
	Branquias	42.56	68.47	6.69 ^{ab}	35.14 ^b	Branquias	2.0E-07	3.7E-07	8.5E-08 ^{ab}	1.7E-07 ^b	
21	Hígado	67.53	150.96	31.20 ^{ab}	88.65 ^{ab}	Hígado	4.3E-07	4.1E-07	1.6E-07 ^a	3.4E-07	
	Intestino	76.88	120.89	44.20 ^{ab}	62.45 ^b	Intestino	2.3E-07	1.1E-07	4.6E-08 ^{ab}	1.5E-07	
	Cerebro	28.83	22.89	15.27	6.86 ^{ab}	Cerebro	5.2E-08	1.0E-07	4.3E-08 ^b	2.9E-08 ^{ab}	
28	Branquias	29.47	20.43	16.30	10.13 ^{ab}	Branquias	4.3E-07	2.5E-07	7.7E-08 ^a	3.2E-08 ^{ab}	
	Hígado	52.10	73.42	30.88 ^b	35.93 ^{ab}	Hígado	4.2E-07	6.7E-07	1.9E-07 ^b	6.1E-08 ^{ab}	
	Intestino	93.99	98.83	40.14 ^{ab}	75.73 ^a	Intestino	1.4E-07	3.4E-07	6.5E-08 ^{ab}	2.2E-07	
28	Cerebro	27.67	41.70	18.37 ^b	16.78 ^b	Cerebro	1.2E-07	1.6E-07	1.1E-07	8.9E-08	
	Branquias	31.03	21.71	16.01	5.66 ^{ab}	Branquias	5.8E-07	8.8E-07	2.6E-07 ^b	5.6E-07 ^b	
	Hígado	45.28	117.37	38.97 ^b	81.01 ^a	Hígado	6.2E-07	8.3E-07	2.4E-07 ^b	3.2E-07 ^{ab}	
	Intestino	38.29	174.98	28.19 ^b	144.67 ^{ab}	Intestino	3.3E-07	5.5E-07	4.9E-07 ^a	4.2E-07	

^a Estadísticamente diferente a los valores de la aditividad mínima.

^b Estadísticamente diferente a los valores de la aditividad máxima. (Tukey HSD $P < 0.05$)

La Tabla 3 muestra la interacción de los valores reales y la aditividad calculada de IBU y AI probados en *D. rerio*. Los valores aditivos de las concentraciones ambientales de IBU y AI se compararon con dos mezclas binarias. En general, para LPO, los valores reales de M1 y M2 fueron significativamente más altos que las interacciones aditivas mínimas y máximas calculadas. Se encontró que los valores de SOD eran variables para mezclas binarias con respecto a ambas interacciones aditivas. En general, se encontró que los valores de CAT y GPX eran más bajos para mezclas binarias en diferentes tejidos y tiempos de exposición con respecto a las interacciones aditivas calculadas (mínima y máxima).

8.2 Resultados embrioletalidad y teratogénesis.

8.2.1 Datos de embrioletalidad de formas aisladas y la mezcla binaria de AI e IBU.

Los valores porcentuales de mortalidad y malformaciones de embriones expuestos a formas aisladas de IBU y AI y la mezcla binaria se presentan en la Tabla 4. El número de malformaciones y muertes aumentó de manera dosis-dependiente, excepto para las concentraciones más altas de IBU (11 y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$) que mostraron una disminución en el número total de embriones con malformaciones. Los valores de LC50 de IBU y AI fueron 8.06 $\mu\text{g L}^{-1}$ (95% [IC: 6.32-9.45]) y 5.0 mg L⁻¹ (95% [IC: 3.99-6.47]) respectivamente, mientras que los valores de EC50 fueron 2.85 $\mu\text{g L}^{-1}$ (95% [IC: 1,47-3,54]) y 3,85 mg L⁻¹ (95% [IC: 2,27-4,13]). Los valores del índice teratogénico fueron 2,82 para IBU y 1,39 para AI. Con base en los valores de TI que oscilaron entre 1,39 y 2,82, ambas sustancias pueden clasificarse como teratogénicas con un potencial embriotóxico relativamente fuerte, especialmente en el caso del AI (Weigt et al., 2011). Los embriones expuestos

a una mezcla compuesta por los valores de CE₅₀ tanto de IBU como de Al mostraron porcentajes de mortalidad y efectos teratogénicos superiores al 50%, por lo que es posible inferir que la combinación de ambas sustancias es potencialmente tóxica para *D. rerio* en etapas tempranas de desarrollo.

Los embriones vivos, muertos y malformados se presentan en la **Fig. 5**. La tasa de embriones vivos disminuyó proporcionalmente a medida que aumentaron las concentraciones de ambas sustancias, por el contrario, la mortalidad y las malformaciones aumentaron a medida que se alcanzaron concentraciones más altas, sin embargo, las concentraciones más altas de IBU (11 y 20 µg L⁻¹), mostraron una disminución en la tasa de embriones malformados. En el caso de la exposición a la mezcla, los valores de mortalidad y teratogénesis fueron superiores a los obtenidos para embriones vivos y normales y las malformaciones fueron múltiples y más graves en comparación con las formas aisladas.

Tabla 4. Porcentajes de embriones muertos y teratogénicos después de la exposición a formas y mezclas aisladas de IBU y Al.

Compuesto	Concentración de exposición	Embriones expuestos	Embriones muertos	Mortalidad (%)	Embriones con malformación	Embriones con efectos teratogénicos (%)
Ibuprofeno (µg L ⁻¹)	0	60	0	0	0	0
	0.1	60	7	11.6	23	38.3
	0.5	60	11	18.3	25	41.6
	1	60	16	26.6	28	46.6
	3	60	19	31.6	31	51.6
	5	60	23	38.3	33	55.0
	7	60	26	43.3	35	58.3
	9	60	35	58.3	39	65.0
	11	60	40	66.6	34	56.6
	20	60	46	76.6	29	48.3
					CL50= 8.06 IC= [6.32-9.45] IT= 2.82	
Alum inio (mg L ⁻¹)	0	60	0	0	0	0
	0.01	60	10	16.6	18	30.0

	0.05	60	12	20.0	20	33.3
	0.1	60	15	25.0	22	36.6
	1	60	17	28.3	27	45.0
	2	60	22	36.6	29	48.3
	4	60	25	41.6	32	53.3
	6	60	32	53.3	42	70.0
	8	60	41	68.3	44	73.3
				CL50= 5.0 IC= [3.99-6.47] IT= 1.39		CE50= 3.58 IC= [2.27-4.13]
Mezcla		60	34	56.6	44	73.3

8.2.2 Principales efectos teratogénicos y alteraciones morfológicas del desarrollo embrionario.

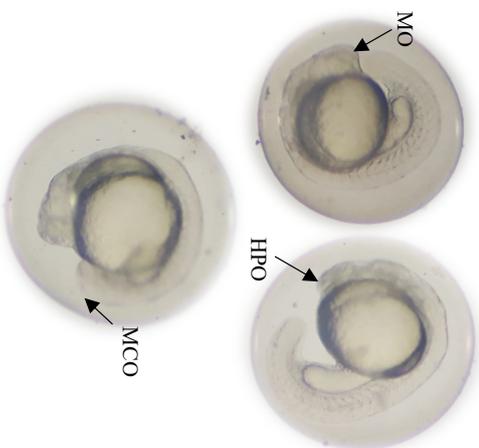
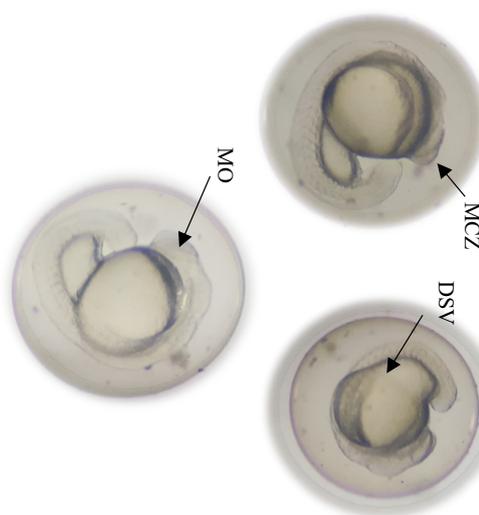
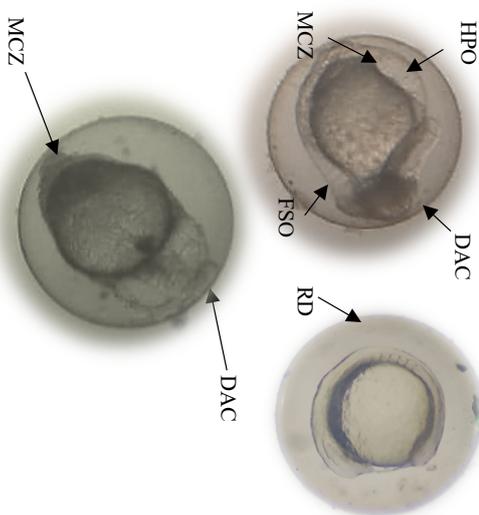
Se observaron varias malformaciones luego de tratamientos con formas aisladas y una mezcla de IBU y Al. Las malformaciones más frecuentes para IBU aislada fueron retraso en el proceso de eclosión, malformaciones de cola y cabeza, casos severos de escoliosis, ausencia de aleta pectoral y edema pericárdico. En el caso de Al, las principales alteraciones fueron el retraso de la eclosión, hipopigmentación, malformación de la cola y la cabeza, ausencia de aleta pectoral y protuberancia bucal, así como edema pericárdico. Las alteraciones de eclosión, malformación de la cola, edema pericárdico, deformación de la cabeza, hipopigmentación, edema pericárdico, ausencia de aleta pectoral y de protuberancia bucal fueron los trastornos más comunes detectados para la mezcla, en cuyo caso las malformaciones fueron múltiples y relativamente más graves en comparación con las formas aisladas, poniendo en riesgo la vida de los embriones.

En la **Tabla 5** se presentan fotografías de las principales malformaciones a diferentes tiempos de exposición. Como se advirtió, el número y la gravedad de las malformaciones aumentaron con el tiempo. A las concentraciones más altas, la mortalidad aumentó debido a la gravedad de las

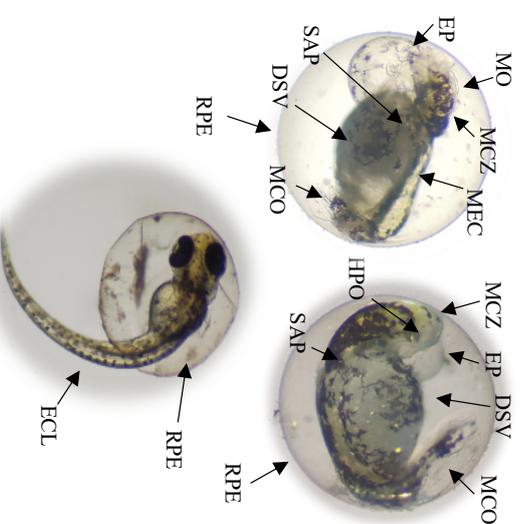
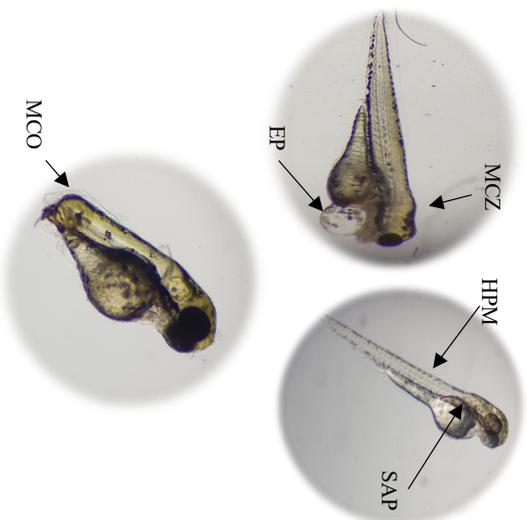
malformaciones. Los porcentajes de las malformaciones más frecuentes de las interacciones aditivas calculadas entre IBU y AI y los valores reales obtenidos después de la exposición a formas aisladas y la mezcla se presentan en la **Tabla 6**. Los resultados muestran que las formas aisladas, la mezcla y los valores aditivos en general aumentaron significativamente en comparación con el grupo de control. Además, los valores de la mezcla y los valores aditivos también fueron significativamente más altos con respecto a las formas aisladas de ambas sustancias. Los porcentajes de retraso del desarrollo, hipopigmentación y malformación de la cabeza obtenidos después de la exposición a la mezcla fueron más altos que las sustancias individuales y la interacción aditiva. Por el contrario, los porcentajes de estructura modificada de la corda y la cola, el edema pericárdico y las alteraciones de la eclosión fueron significativamente menores que los valores de interacción aditiva.

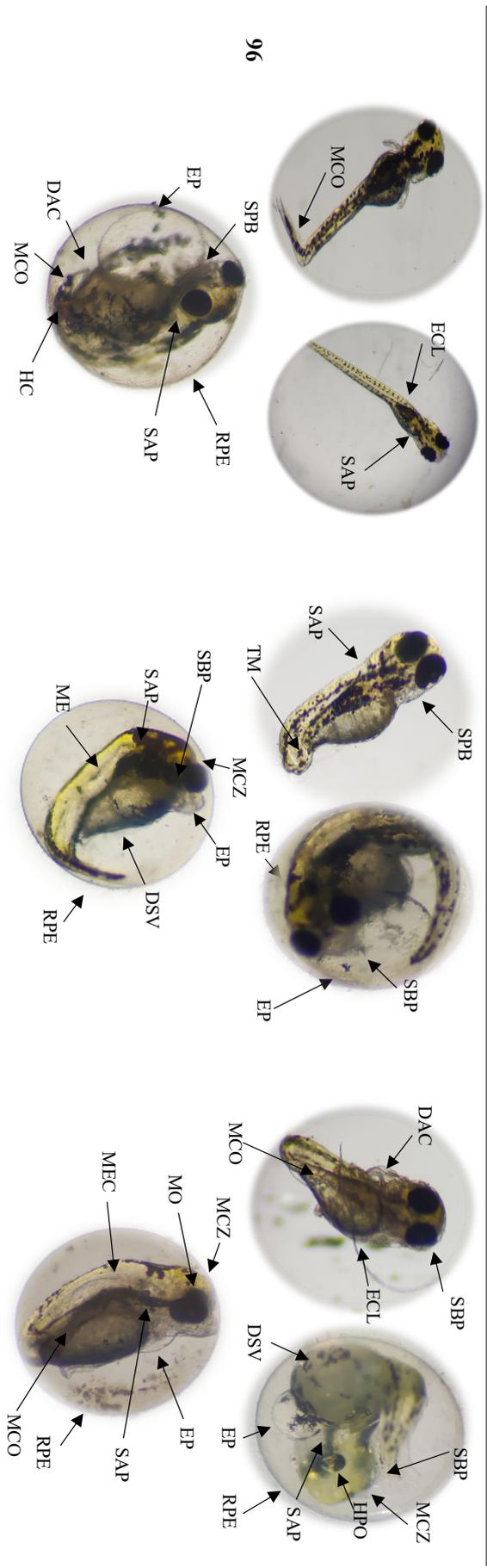
Tabla 5. Fotografías representativas de las principales malformaciones encontradas en embriones de *Danio rerio* después de la exposición a formas aisladas de AI, IBU y la mezcla binaria.

Malformaciones

hpf	IBU	AI	Mixture
12			







DAC = desarrollo anormal del cuerpo; **RPE** = retraso en el proceso de eclosión; **RD** = retraso en el desarrollo; **HPO** = hipoplasia ocular; **MO** = malformación ocular; **HC** = hemorragia en el cuerpo; **MCZ** = malformación de la cabeza; **HPM** = hipopigmentación; **HSV** = hemorragia del saco vitelino; **FSO** = falta de somitas; **MEC** = modificación en la estructura de la corda; **SPB** = sin protuberancia bucal; **EP** = edema pericárdico; **EPT** = eclosión prematura; **ECL** = escoliosis; **MCO** = malformación de la cola; **SAP** = sin aleta pectoral; **DSV** = deformación del saco vitelino; **ESV** = edema del saco vitelino.

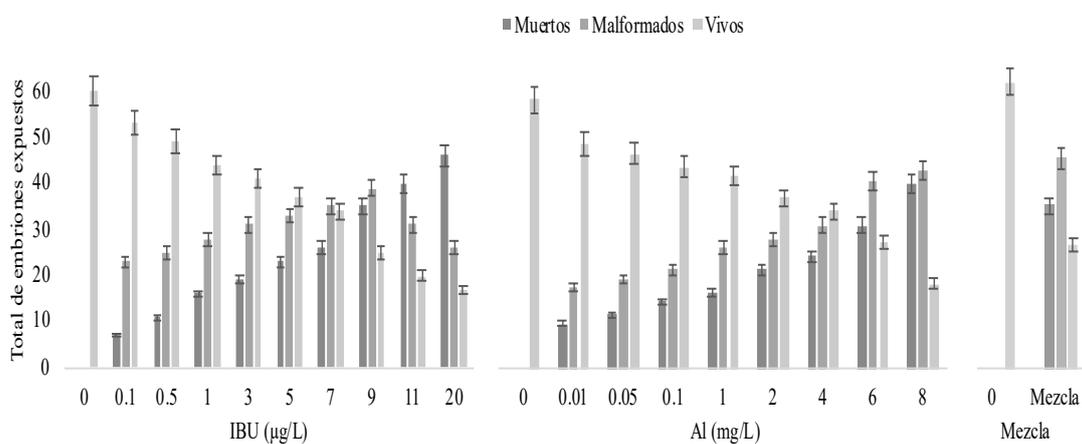
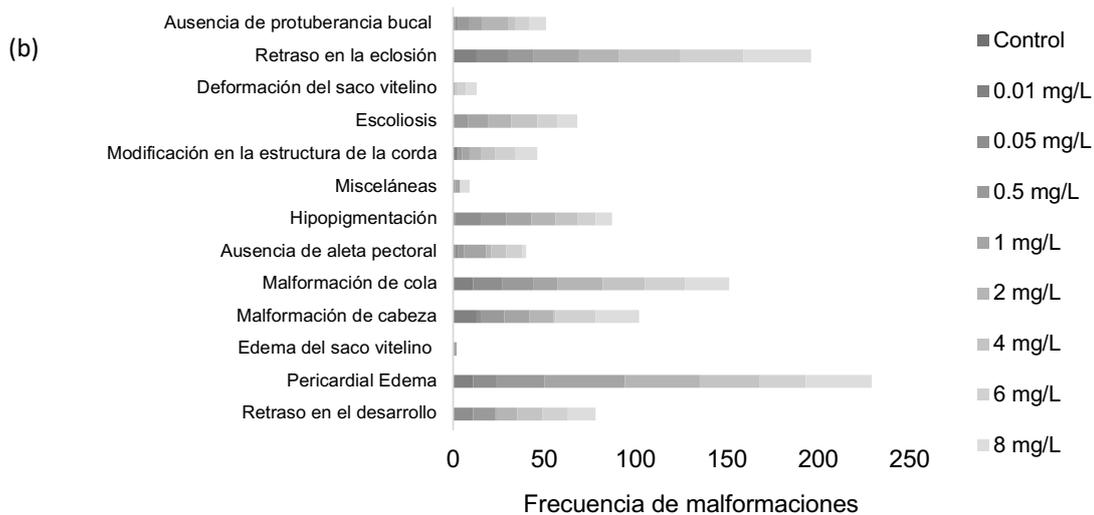
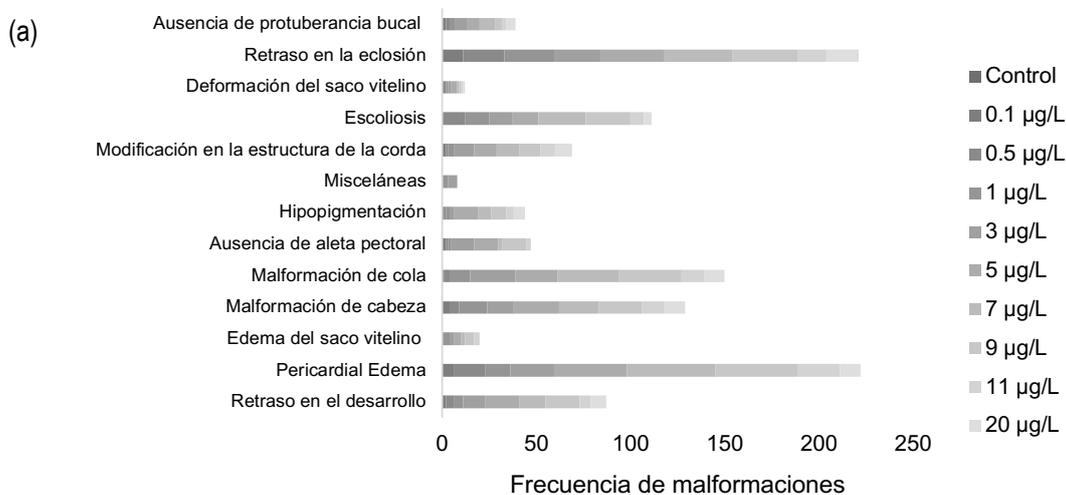


Figura 5. Supervivencia, mortalidad y malformaciones cuantificadas en embriones expuestos a IBU, Al y la mezcla.



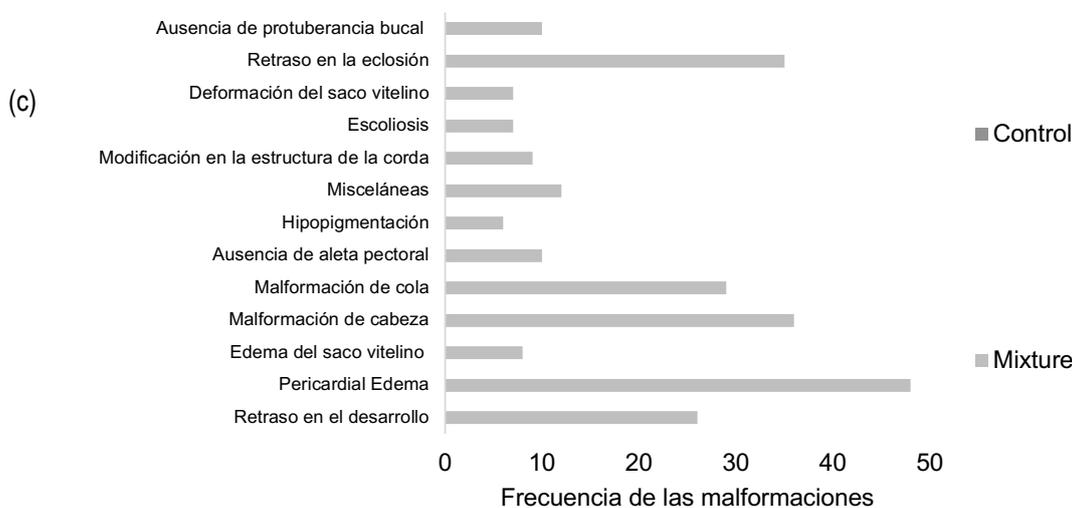


Figura 6. Frecuencia de malformaciones inducidas por formas aisladas de ibuprofeno (a), aluminio (b) y la mezcla (c) en embriones de *D. rerio*.

Tabla 6. Porcentajes de las malformaciones más frecuentes de los valores reales obtenidos tras la exposición a formas aisladas y la mezcla y las interacciones aditivas calculadas entre IBU y Al.

Malformación	Control	Ibuprofeno	Aluminio	Interacción aditiva	Mezcla
-Retraso desarrollo	0%	14.5% a,d,e	16.25% a,d,e	30.75%	43.3% a,b,c,d
-Malformación de cabeza	0%	21.5% a,d,e	21.25% a,d,e	42.75%	60% a,b,c,d
-Estructura modificada de corda y cola	0%	36.9% a,d,e	40.9%a,d,e	77.8%	56% a,b,c,d
-Hipopigmentación	0%	7.3% a,c,d,e	21.87% a,b,d,e	29.17%	36% a,b,c,d
-Edema Pericárdico	0%	37% a,d,e	38.3% a,d,e	75.3%	66.6% a,b,c,d
-Alteraciones en la eclosión	0%	36.8% a,b,d,e	40.83%a,d,e	77.63%	58.3% a,b,c,d

^a Diferencia significativa con respecto al grupo de control

^b Diferencia significativa con respecto al grupo tratado con ibuprofeno.

^c Diferencia significativa con respecto al grupo tratado con aluminio.

^d Diferencia significativa con respecto a la interacción aditiva.

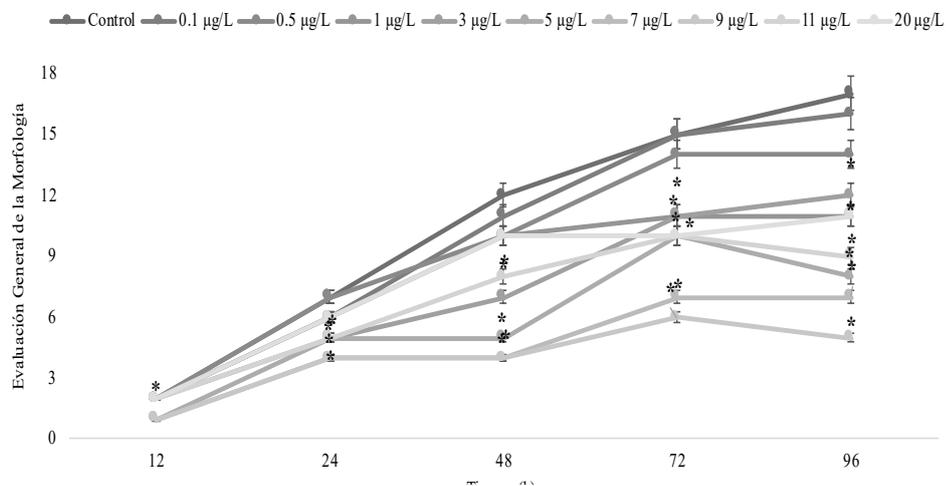
° Diferencia significativa con respecto al grupo tratado con la mezcla.

Prueba ANOVA y Tukey HSD. ($p < 0,05$)

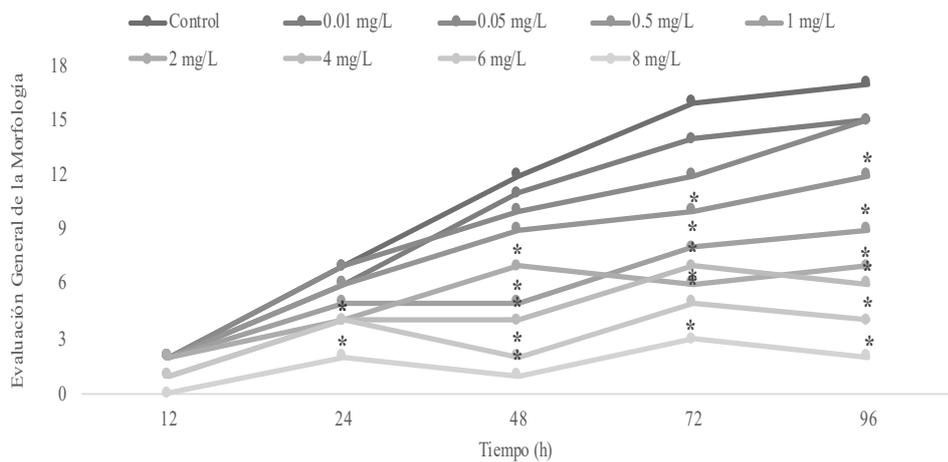
8.2.3 Puntaje de desarrollo de embriones de *D. rerio*.

Los embriones de *D. rerio* exhibieron deformaciones múltiples y específicas después de la exposición a formas aisladas y la mezcla. El número de embriones que presentaban anomalías morfológicas (organismos con evidentes efectos teratogénicos) y los que presentaban alguna alteración del desarrollo cuando se aplicó la medida de puntuación, se mostró dosis dependiente en todo momento de exposición. La **figura 7** muestra cambios estadísticamente significativos ($P \leq 0.05$) entre las curvas de concentración-respuesta de los embriones expuestos a IBU, Al y la mezcla en comparación con el grupo de control, demostrando que existe un efecto nocivo continuo y gradual en el desarrollo de los embriones después de la exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de ambas sustancias. Se observaron disminuciones estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) en la puntuación de desarrollo a concentraciones más altas de formas aisladas y después de la exposición a la mezcla, lo que sugiere que estas dos sustancias en combinación son capaces de retrasar el proceso de desarrollo normal de la embriogénesis.

(a)



(b)



(c)

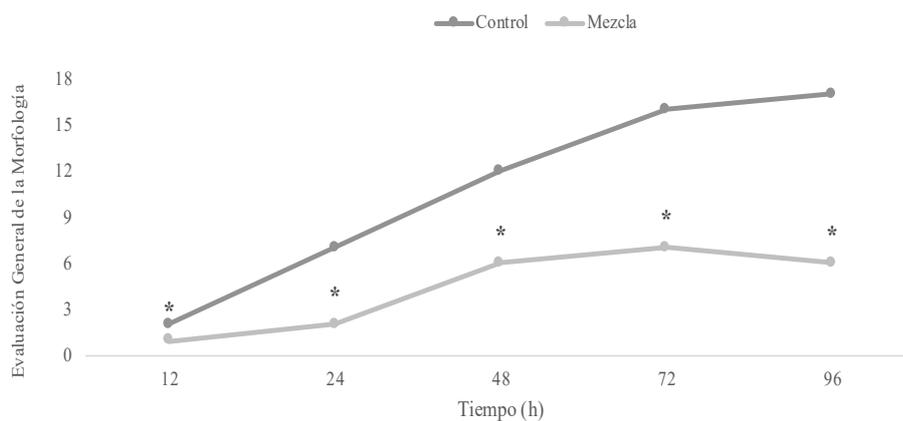


Figura 7. Curvas de concentración-respuesta de IBU (a), Al (b) y la mezcla (c) en embriones de *D. rerio*.

8.2.4 Evaluación de la frecuencia cardíaca.

Para determinar el deterioro cardíaco causado por la exposición en larvas de pez cebra, se realizó la determinación de la frecuencia cardíaca. Después de que los embriones fueron expuestos a varias concentraciones de IBU y Al, encontramos que la frecuencia cardíaca en las larvas (72 hpf) disminuyó de manera dosis dependiente en comparación con el grupo de control **Fig. 8**. La mezcla también mostró una disminución estadísticamente significativa en comparación al grupo de control. Estos resultados apoyan la hipótesis de que IBU, Al y la mezcla pueden actuar como cardiotoxinas en el pez cebra en etapa temprana de desarrollo debido a alteraciones de la frecuencia cardíaca, sin embargo, se necesita llevar a cabo investigación adicional para identificar completamente los mecanismos individuales e interactivos específicos involucrados en este biomarcador.

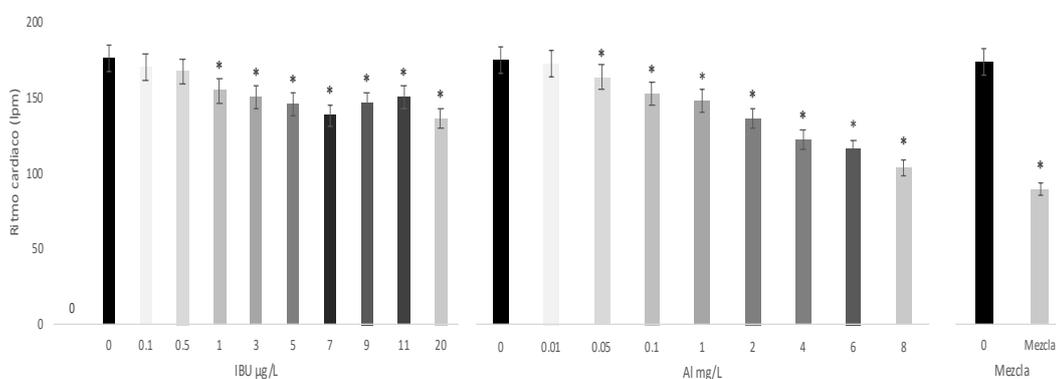


Figura 8. Frecuencia cardíaca de las larvas de pez cebra (72 hpf) expuestas a diferentes concentraciones de ibuprofeno, aluminio y la mezcla binaria.

9. Discusión.

9.1 Discusión de resultados.

9.1.1 Biomarcadores de oxidación celular.

La exposición a compuestos farmacéuticos y metales promueve la sobreproducción de especies radicales e induce efectos nocivos como daño oxidativo y agotamiento de las defensas antioxidantes en especies acuáticas (Abdalla et al., 2019; Sivakumar et al., 2012). En México, las autoridades regulatorias han establecido concentraciones máximas permitidas de Al para agua potable (0.02 mg L^{-1}) y protección de la vida acuática ($0.05\text{-}0.1 \text{ mg L}^{-1}$) (SEDUE, 1989), sin embargo, la presencia de fármacos en ecosistemas acuáticos permanece sin regulación alguna. Sobre este tema, el presente estudio tiene como objetivo evaluar si la exposición aguda y sub-crónica a formas aisladas y mezclas binarias de ibuprofeno y aluminio es capaz de estimular los mecanismos de toxicidad implicados en el daño oxidativo a las moléculas diana en organismos en edad juvenil de pez cebra *D. rerio* y embriotoxicidad y efectos teratogénicos en embriones de la misma especie.

El IBU es un derivado del ácido propiónico (Montes et al., 2016) conocido por intervenir en la síntesis de prostaglandinas (PGE2) en humanos y animales (Manku et al., 2019; Wagner et al., 2019). Estos ácidos grasos autocrino-paracrinos producidos por el metabolismo del ácido araquidónico, también están involucrados en las contracciones musculares y atonía, presión arterial y circulación, neurotransmisión, transporte de iones a través de membranas celulares, ovulación, entre otros (Cleuvers, 2004; Takahashi et al., 2018). El IBU es detectado con frecuencia en aguas superficiales y efluentes de PTAR's a niveles de ng a $\mu\text{g L}^{-1}$. A pesar de los bajos niveles ambientales, el IBU y sus metabolitos, junto con otros contaminantes químicos, pueden presentar un peligro potencial para la salud humana y el ecosistema acuático (Illés et al., 2013).

Se ha demostrado que el IBU sufre reacciones abióticas y bióticas debido a las condiciones ambientales y diversas enzimas de biotransformación del citocromo P450 (CYP) presentes en varios tejidos de peces (Islas-Flores et al., 2017a). En los seres humanos, los compuestos originales generalmente se excretan junto con los productos metabólicos. El IBU se excreta como producto inalterado (1%) y metabolitos principalmente hidroxilo (25%) y derivados carboxilo (37%), así como compuestos de ibuprofeno conjugado (14%) (Ferrando-Climent et al., 2012; Kasprzyk-Hordern et al., 2008).

Al igual que en los mamíferos, se han encontrado productos de transformación biótica IBU y rutas metabólicas similares en especies de peces. Según Gomez et al., (2011) el 2-hidroxi-ibuprofeno fue el principal metabolito encontrado en los microsomas branquiales y hepáticos de *Oncorhynchus mykiss*. Las larvas de pez cebra pueden metabolizar IBU a un producto considerado un metabolito principal en mamíferos (padre hidroxil-ibuprofeno), lo que sugiere que CYP2C9 y CYP2C19 también están presentes en los tejidos del pez cebra Jones et al., (2012). Los productos de transformación abiótica del ibuprofeno incluyen a la 4-isobutilacetofenona, 1-(6-metoxi-2-naftil) etanol y 2-acetil-6-metoxinaftaleno (Loaiza-Ambuludi et al., 2013). Se ha demostrado que estos productos de transformación (TP) son más tóxicos para los organismos acuáticos que el compuesto original (Illés et al., 2013; Michael et al., 2014). La captación y bioconcentración de compuestos farmacéuticos dependen de propiedades fisicoquímicas como la lipofilicidad (Kow) y la vida media en los sistemas biológicos (distribución, metabolismo y excreción) (Bhandari & Venables, 2011). El carácter hidrófobo del ibuprofeno (Log Kow = 3,97) indica que es posible la bioconcentración en los tejidos de los peces (Ferrando-Climent et al., 2012).

Aunque algunos API's pueden tener una baja persistencia y un comportamiento no bioacumulativo, el ingreso constante de estos compuestos en el medio ambiente y la falta de tratamientos de aguas residuales adecuados y eficientes conduce a la liberación de contaminantes como compuestos

parentales o como metabolitos activos y más estables que son incluso más peligrosos para el medio ambiente que muchos otros contaminantes convencionales como pesticidas o metales (Benz et al., 2005; Rozas et al., 2016).

El aluminio no se considera esencial para la biota, su biodisponibilidad se ve fuertemente afectada por los parámetros fisicoquímicos del medio acuático (Santore et al., 2018; Trenfield et al., 2012b). La toxicidad del Al se ve fuertemente afectada por la solubilidad y la especiación, parámetros directamente correlacionados con los cambios en el pH del agua (DeForest et al., 2018b). En nuestro estudio, se consideró el pH del agua de prueba = 6.0-6.3 ya que representa el rango de pH más bajo de muchas aguas naturales que se encuentran en Europa, Estados Unidos y México (Cardwell et al., 2018b; González-González et al., 2014a). Además de ello, la biodisponibilidad de los metales aumenta cuando el pH es inferior a 6,5 a medida que se encuentran formas más solubles (Coz et al., 2004).

Se ha comprobado que especies de peces teleósteos como *Cirrhinus mrigala*, *Geophagus brasiliensis*, *O. mossambicus* y *M. salmoides* presentaron concentraciones más altas de Al en branquias y tejidos intestinales, lo que sugiere que este metal es capaz de bioacumularse después de una exposición prolongada (Oberholster et al., 2012b; Sivakumar et al., 2012; Voigt et al., 2015). La bioconcentración conduce a la generación de efectos tóxicos a largo plazo debido al aumento de las concentraciones tisulares internas (Nallani et al., 2011).

La peroxidación lipídica es un fenómeno oxidativo mediante el cual los ácidos grasos poliinsaturados reaccionan con ROS y RNS para formar hidroperóxidos, MDA y 4-hidroxi-2-nonenal como productos finales (Gentile et al., 2017; Guéraud et al., 2010; Wilhelm et al., 2009). Como se puede observar en la **Fig. 1**, en general, se obtuvieron valores más altos de MDA en las muestras expuestas a mezclas binarias que en las expuestas a formas aisladas, siendo el hígado y el intestino los tejidos más dañados. Por otro lado, se ha reportado que a partir de la oxidación

lipídica se pueden desencadenar otros fenómenos como la oxidación de proteínas (Wong et al., 2008) (Wong et al., 2008). (Yao & Rahman, 2011) mencionaron que la carbonilación de proteínas, que es la generación de grupos carbonilo reactivos como aldehídos y cetonas, entre otros, mediante la acción de moléculas de radicales hidroxilo altamente reactivas que oxidan los residuos de aminoácidos o el esqueleto proteico, puede ser considerado un criterio de valoración importante del estrés oxidativo, ya que provoca modificaciones irreversibles en la estructura y pérdida de función de varias proteínas (Dalle-Donne et al., 2003; Fritz & Petersen, 2011; Stadtman & Levine, 2003).

El daño oxidativo observado en el cerebro particularmente debido a la exposición de mezclas binarias IBU-Al está de acuerdo con (Fernández-Dávila et al., 2012b; Maheswari et al., 2014; Xia et al., 2017b). Varios estudios asocian enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el desarrollo de la enfermedad de Parkinson con el desequilibrio redox provocado por Al, ya que el cerebro es un tejido altamente vulnerable al estrés oxidativo debido a su alto consumo de O₂, constitución rica en hierro y ácidos grasos, así como sus limitadas defensas antioxidantes (Dehay & Bezdard, 2011; Nunes et al., 2017). El desequilibrio redox provocado por el aluminio, debido al deterioro mitocondrial, puede estar asociado con el daño cerebral. Las mitocondrias se consideran una fuente primaria de ERO's. Además, las mitocondrias se consideran un objetivo importante para el daño inducido por especies reactivas observado en eventos patológicos vinculados con trastornos neurodegenerativos (Maya et al., 2016b). Kumar et al., (2009) reportan que la exposición crónica a Al disminuyó la actividad de MnSOD con el potencial de interrumpir la defensa antioxidante afectando el potencial de eliminar los aniones superóxido de las mitocondrias; incrementando la peroxidación de lípidos y la carbonilación de proteínas en el cerebro de rata. Aunque el Al es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica Richetti et al., (2011) al unirse a la proteína transportadora de transferrina (Supriadi et al., 2019), el IBU no puede cruzar fácilmente

debido a sus propiedades fisicoquímicas (Brown et al., 2007). Las proteínas alteradas por ERO's se han relacionado con la enfermedad de Alzheimer (EA) en mamíferos (Dalle-Donne et al., 2003). Diversas evidencias muestran que el Al puede ser considerado un factor etiológico en la EA (Mustafa, 2020), por lo que es posible inferir que el daño oxidativo generado por el aluminio puede ser un mecanismo que participa en el desarrollo de diferentes trastornos neurodegenerativos.

Se sabe que los AINE's, incluido el IBU, afectan el metabolismo mitocondrial con las consiguientes alteraciones de la fosforilación oxidativa, lo que conduce a una producción creciente de ERO's, en particular el anión superóxido ($O^{\cdot-}_2$), hinchazón de la membrana mitocondrial y, en algunos casos, inducción de la apoptosis (Asensio et al., 2007). Este fenómeno se ha explicado en parte por la inhibición estereoselectiva de la vía de beta-oxidación que presentan la mayoría de los AINE's, atribuida a la competencia por el conjunto de CoA o la inhibición de la acetil-CoA carboxilasa (Wardhani, 2015). Según Tsume et al., (2012) el IBU se considera un ácido orgánico débil debido a su valor de constante de acidez (pKa) de 4,45. Algunos estudios consideraron que determinados ácidos débiles son responsables de la disfunción mitocondrial al desacoplar la fosforilación oxidativa.

De acuerdo con el presente estudio, se observaron valores aumentados de MDA particularmente en el tejido branquial generado por formas aisladas de IBU (Flippin et al., 2007; Islas-Flores et al., 2017b) y aluminio (Allin & Wilson, 2000; Grassie et al., 2013; Griffitt et al., 2008) en peces. En los teleósteos, las branquias representan el sitio principal de contacto con el entorno circundante, por lo que desempeñan un papel clave en el intercambio de gases, los mecanismos de regulación osmótica e iónica celular y sistémica (Choe et al., 2006; Evans et al., 2005). La creciente evidencia muestra que las enzimas COX y las prostaglandinas tienen el potencial de modificar la actividad de varias hormonas como el cortisol (liberado en respuesta al estrés) y la $Na^+ / K^+ - ATPasa$ branquial relacionada con la regulación osmótica e ióno-reguladora en el tejido de las branquias

de los peces (Van Anholt et al., 2012). Choe et al., (2006) demostraron la creciente expresión de COX2 en las células cloro branquiales de *Fundulus heteroclitus* después de cambios de salinidad crónicos y abruptos, lo que sugiere que la COX2 desempeña un papel importante en los mecanismos de regulación iónica y la homeostasis en las branquias. Por otro lado, se ha demostrado que el aluminio iónico puede causar toxicidad a los peces principalmente a través de la interacción con las branquias. Griffitt et al., (2008) demostraron que la exposición aguda a $AlCl_3$ disminuye la actividad de $Na^+ / K^+ - ATPasa$ en las branquias con el consiguiente deterioro de las actividades tanto osmóticas como iónicas reguladoras. Grassie et al., (2013) descubrieron que los peces expuestos a Al en condiciones ácidas aumentaron la acumulación del metal en las branquias y causaron una capacidad osmorreguladora deteriorada, lo que provocó estrés fisiológico observado mediante niveles elevados de cortisol y glucosa en plasma. Sivakumar et al., (2012) mencionaron que las branquias actúan como el principal mecanismo de barrera que impide la absorción de metales del medio circundante, sin embargo, encontraron una concentración significativa de Al en las branquias de *Cirrhinus mrigala* debido a la generación de una capa de moco espeso que cubre el órgano causando hipoxia en lugar de alteraciones ionorreguladoras. Estudios previos demuestran que el Al es capaz de producir estrés respiratorio como resultado de los hidróxidos de Al que se precipitan en la superficie de las branquias del pez cebra, lo que resulta en la acumulación de células de cloruro, hinchazón lamelar y producción excesiva de moco (Griffitt et al., 2008; Vuorinen et al., 2003). Al igual que en nuestro estudio, Gonzalez-Rey & Bebianno, (2012b) encontraron que los fármacos inflamatorios no esteroideos junto con el cobre eran capaces de promover una mayor inducción de la peroxidación lipídica en las branquias de *Mytilus galloprovincialis*.

Se encontraron niveles incrementados de MDA en tejido hepático principalmente en muestras expuestas a formas aisladas en concentraciones máximas, así como en mezclas binarias. El

hígado juega un papel clave en el almacenamiento, redistribución, transformación y detoxificación de xenobióticos, ya que actúa como un sitio activo de efectos nocivos inducidos por contaminantes. Los metabolitos formados durante las vías metabólicas pueden provocar un daño considerable en este órgano (Martínez-vieyra et al., 2017). Se cree que el aumento de la actividad de ciertas isoformas del citocromo P450 que se encuentran en los hepatocitos desempeña un papel en el daño oxidativo, ya sea a través de la biotransformación directa del ibuprofeno en metabolitos electrofílicos que atacan los centros nucleofílicos de biomoléculas o mediante la formación indirecta de ROS a través del ciclo redox (Abdollahi et al., 2004). Diversos estudios señalan que los subproductos de IBU podrían incrementar la producción de ROS, induciendo alteraciones en la homeostasis de especies pro-oxidantes y antioxidantes que pueden conducir al aumento del daño celular (Parolini et al., 2011b). Las *p*-benzoquinonas tóxicas formadas durante la transformación biótica y abiótica de IBU son moléculas con un fuerte comportamiento electrofílico con alta afinidad por lípidos nucleofílicos, proteínas de membrana, enzimas o incluso bases de ADN (Bakr & Rahaman, 2019). Además, los acil-glucurónidos derivados de IBU son capaces de formar enlaces covalentes y aductos con residuos de aminoácidos nucleofílicos con consecuencias nocivas para las proteínas intra- y extracelulares, así como el ADN (Iwamura et al., 2017). Nuestros resultados están de acuerdo con Islas-Flores et al. (2014) y (Ogueji et al., 2017) quienes concluyeron que los valores de LPX en tejido hepático aumentaron significativamente después de la exposición a IBU en *C. carpio* y *Clarias gariepinus*, respectivamente. Se han propuesto varios mecanismos para explicar el daño hepático inducido por Al. Este metal no tiene capacidad redox en sistemas biológicos ya que tiene un estado de oxidación fijo, sin embargo, se considera un ion pro-oxidante fuerte (Fernández-Dávila et al., 2012b) ya que es capaz de interrumpir el metabolismo del Fe aumentando su concentración intracelular y por ende promoviendo la reacción de Fenton (Yousef, 2004).

También se cree que este metal causa un daño directo a las mitocondrias y el transporte de electrones en la cadena respiratoria (García-Medina et al., 2010a). Diversos estudios muestran que el aluminio es capaz de interactuar de forma directa (ion-proteína) e indirecta (proteína-proteína) con varias proteínas asociadas a numerosos procesos biológicos, componentes celulares, así como funciones moleculares en diferentes organismos (Hasan et al., 2018). Este órgano, que se considera un sitio primario de proteínas de unión a metales, puede mostrar una mayor concentración de metales pesados como el aluminio (Sivakumar et al., 2012) (y, por lo tanto, se espera un daño oxidativo importante. Abreo et al., (2004) concluyeron que la acumulación de Al en las células podría causar un aumento en el hierro catalítico y, por lo tanto, producir ERO's resultando en daño a los hepatocitos de ratones. Como en nuestro estudio, Jolly et al., (2014) encontraron que la exposición sub-crónica a Al ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) aumentó significativamente los productos de peroxidación de lípidos en el hígado de *Rutilus rutilus L.*

Los valores aumentados de LPO en el intestino de *D. rerio* encontrados en nuestro estudio están en concordancia con Goldsmith et al., (2013) quienes encontraron que algunos AINE's eran capaces de inducir el estrés del retículo endoplásmico y mitocondrial al detener la respuesta de estrés celular en el tejido intestinal. Se ha informado que, debido a las propiedades fisicoquímicas de la mayoría de los AINE's, principalmente acidez débil y lipofiliidad, son capaces de interactuar con los fosfolípidos de la membrana celular y desacoplar la fosforilación oxidativa mitocondrial que conduce a alteraciones en la función de la barrera gastrointestinal en ambos. humanos y ratones expuestos a fármacos antiinflamatorios durante largos períodos de tiempo (Morteau et al., 2000; Takeuchi et al., 2006). Los daños observados en los tejidos gastrointestinales se explican en parte porque los AINE actúan como moléculas anfifílicas capaces de alterar la hidrofobicidad de la mucosa gastroduodenal debido a la interacción con la bicapa de fosfolípidos celulares, así como a la inhibición del sistema enzimático COX (Bjarnason et al., 2018) . Aunque el pez cebra no posee

la misma morfología intestinal que se ve en los vertebrados superiores, existe una homología funcional entre ellos (Brugman, 2016). De hecho, el pez cebra se ha utilizado como modelo para inducir químicamente la inflamación, ya que muestra cambios similares en el tejido intestinal, la participación microbiana y la respuesta a los fármacos antiinflamatorios. Las consecuencias dañinas de la reducción de la síntesis de prostaglandinas ejercida por los AINE's en los tejidos intestinales son, entre otras, el aumento de la permeabilidad intestinal, la inflamación y las úlceras principalmente debido a la interacción y desacoplamiento fosfolípido-AINE (Bjarnason et al., 2018). Los intestinos representan el contacto principal con el entorno dietético al formar la mayor superficie del cuerpo y una barrera importante entre el entorno interno y externo. Estudios anteriores demostraron que los intestinos proporcionan una barrera de defensa contra múltiples agentes dañinos como patógenos y agentes nocivos (Niklasson et al., 2011). La captación de aluminio a través de la vía gastrointestinal en vertebrados superiores es un tema complejo fuertemente influenciado por el pH, la especiación química del Al, sustancias de coexistencia, entre otros (Vignal et al., 2016). Oberholster et al., (2012b) determinaron concentraciones de Al total en diferentes tejidos de peces y detectaron que se encontraron concentraciones más altas del metal en los intestinos de *O. mossambicus* y *M. salmoides*, lo que sugiere que la bioacumulación de Al era posible. El estrés oxidativo inducido por metales en los tejidos intestinales se ha estudiado previamente. El pez cebra exhibió efectos oxidativos en el tejido intestinal después de la exposición a 5 mg L⁻¹ de nanopartículas de ZnO debido a la creciente formación de OH· (Xiong et al., 2011). Las partículas de cobre también se han asociado con la inducción de estrés oxidativo en el intestino de la carpa herbívora *Ctenopharyngodon idella* observada a través de valores significativamente altos de MDA intestinal en comparación con los grupos de control (Jiang et al., 2016).

9.1.2 Resultados de biomarcadores de actividad antioxidante.

En este estudio, se evaluó el estado oxidativo de las muestras expuestas de *Danio rerio* midiendo el biomarcador oxidativo LPX, así como la capacidad antioxidante del bioindicador para neutralizar el daño celular en diferentes tejidos.

La producción sostenida de especies de radicales se considera un fenómeno normal de los procesos metabólicos en las células (Urso & Clarkson, 2003). Como mamíferos, los peces teleósteos poseen un sistema de defensa antioxidante conocido por neutralizar la generación endógena de ROS (Venditti et al., 2013).

Como se indicó anteriormente, se encontró que la actividad de SOD (Fig. 2) se incrementó principalmente en aquellas muestras expuestas a mezclas binarias, sin embargo, este comportamiento no fue consistente a lo largo del tiempo. Además, la actividad antioxidante enzimática fue mayor en las branquias y el hígado. Nuestros resultados fueron consistentes con estudios previos; González-González et al., (2014b) observaron aumentos significativos en la actividad de la enzima superóxido dismutasa en los tejidos de la carpa común después de una exposición aguda a un efluente que contiene AINE y metales pesados. Song et al., (2018) encontraron que la actividad de SOD en el cerebro del pez cebra no mostró cambios significativos a los 7 y 14 días, pero aumentó a los 28 días después de la exposición a IBU. En contraste, se encontró que IBU induce disminuciones significativas de la actividad de SOD con respecto al grupo de control en *Hyallorella azteca* expuesta a 1.7 mg L⁻¹ después de una prueba aguda, mientras que la actividad de CAT aumentó significativamente (Gómez-Oliván, Neri-Cruz, et al., 2014)

Este comportamiento puede explicarse porque el radical anión superóxido se forma durante los procesos normales de fosforilación oxidativa celular y en el caso de los AINE's se considera un subproducto reactivo del metabolismo oxidativo que tiene lugar en las mitocondrias (Gómez-Oliván, Galar-Martínez, et al., 2014b). Valko et al., (2005) sugieren que una actividad SOD

significativamente alta puede compensar los efectos oxidativos inducidos por metales pesados como una respuesta adaptativa del organismo para contrarrestar el daño celular. Nuestros valores de actividad de SOD significativamente aumentados son consistentes con los resultados de Razo-Estrada et al., (2013) quienes concluyeron que la exposición a 0.05 hasta 220 mg L⁻¹ de Al fue capaz de aumentar la actividad antioxidante de la SOD en el hígado de *C. carpio*. La falta de respuesta de SOD también observada en tejidos donde los valores de actividad enzimática no mostraron diferencias significativas podría deberse a una capacidad debilitada de *D. rerio* para responder a través de un comportamiento adaptativo causado por el daño irreversible ejercido en la enzima antioxidante.

Los valores de catalasa (**Fig. 3**) mostraron variabilidad en la actividad enzimática. Se encontraron valores de CAT más altos en hígado e intestino. La regulación positiva de CAT y otras enzimas antioxidantes está relacionada con la presencia de productos de peroxidación lipídica como hidroperóxidos y MDA (Khan et al., 2013). Los valores aumentados de actividad de CAT después de la exposición a IBU observados en este estudio son consistentes con (Parolini et al., 2011b) quienes encontraron aumentos moderados en la actividad de CAT en *Dreissena polymorpha* después de la exposición a 1-35 nM de IBU, así como una activación notable de GPX y Razo-Estrada et al. (2013) quienes informaron resultados similares y concluyeron que se indujeron valores significativamente altos de actividad CAT después de la exposición a dosis bajas de Al en el hígado de *C. carpio*. Como se observó en este estudio, la actividad de la catalasa en el tejido hepático de los peces dorados se correlacionó positivamente en los casos correspondientes con los niveles de MDA debido al hecho de que los productos de peroxidación de lípidos pueden estar involucrados en la regulación al alza de CAT ya que se observaron valores más altos en grupos con un notable daño oxidativo (Bagnyukova et al., 2006). Las variaciones en la actividad enzimática de la CAT después de la acción oxidante de los tóxicos pueden explicarse debido a

que las actividades enzimáticas antioxidantes concomitantes varían como un intento de recuperar los niveles homeostáticos de referencia.

Como se observa en la **Fig. 4**, los valores de la actividad antioxidante de GPX aumentaron tanto en concentraciones máximas de formas aisladas como en mezclas binarias en branquias e hígado. También se encontraron valores estadísticamente aumentados de actividad GPX después de la exposición a IBU (Gutiérrez-Noya et al., 2020) y Al (González-González et al., (2014) en diferentes tejidos de peces. Como se observa en la actividad de SOD y CAT, tampoco se detectaron diferencias significativas en el cerebro, las branquias y el intestino en diferentes tiempos de exposición para formas aisladas y mezclas binarias. Este comportamiento puede explicarse por el efecto sobre el estrés oxidativo inducido por Al, ya que SOD, CAT y GPX pueden considerarse posibles moléculas diana de toxicidad por Al, ya que estas enzimas dependen de varios metales traza como para funcionar correctamente (Kumar et al., 2009) o por agotamiento de las concentraciones de glutatión antioxidante que actúa como agente quelante de metales y sustrato de enzimas depuradoras (Hossain et al., 2012). El Al es capaz de formar complejos fuertes con varios bioligandos que incluyen proteínas de alto peso molecular como la transferrina y moléculas de bajo peso molecular como el citrato (De Noronha et al., 2007). Según (Jon I. Mujika et al., 2018; Ruipérez et al., 2012), este metal puede unirse con el anión superóxido dando como resultado un complejo de anión superóxido de aluminio, que parece tener un carácter pro-oxidante más fuerte que el superóxido por sí solo cuando promueve la formación de especies radicales en sistemas biológicos. Este comportamiento podría explicar en parte que, aunque en el presente estudio se encontraron valores crecientes de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa principalmente para mezclas binarias en ciertos tejidos en momentos específicos de exposición, también se observaron valores significativamente mayores de peroxidación lipídica. Hasan et al., (2018)

detectaron que los iones Al eran capaces de interactuar (ion-proteína / proteína-proteína) afectando la función biológica normal de las proteínas diana, incluidas las enzimas antioxidantes CAT y GPX, con la consiguiente pérdida de función catalítica.

Como se observa en la **Tabla 3**, las actividades antioxidantes de SOD, CAT y GPX mostraron variación para mezclas binarias en comparación con la interacción aditiva de formas aisladas de IBU y Al a concentraciones tanto mínima como máxima en todos los tejidos evaluados en diferentes tiempos de exposición. Se observaron disminuciones principalmente significativas en todas las actividades antioxidantes enzimáticas con respecto a los valores calculados del aditivo. Según Gonzalez-Rey & Bebianno, (2014), la acción conjunta de metales como el cobre con fármacos antiinflamatorios no esteroideos podría producir interacciones antagonistas en comparación con compuestos aislados al promover disminuciones significativas en las actividades de SOD y CAT como se observa en el presente estudio. El Al es capaz de promover la oxidación enzimática, así como de modificar la actividad de las enzimas antioxidantes debido a su capacidad para interactuar e interrumpir la distribución de los metales traza esenciales (Zn, Se, Cu, Fe) que forman parte de los sitios y funciones catalíticas de las enzimas antioxidantes (Guo et al., 2002). Por otro lado, los API's como IBU se consideran un inductor potencial de estrés oxidativo, ya que la farmacodinamia de la mayoría de los productos farmacéuticos se basa en la reactividad redox específica (Martin-Diaz et al., 2009). El IBU es capaz de alterar la actividad enzimática como resultado de una sobreproducción de $O_2^{\cdot-}$ o como una acción directa del fármaco sobre la síntesis de las enzimas.

9.1.3 Resultados de embriotoxicidad y teratogénesis.

Por otro lado, los resultados relacionados con la embriotoxicidad de la IBU muestran que la CL₅₀, CE₅₀ y TI de 96 h fueron de 8,06 $\mu\text{g L}^{-1}$, 2,85 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 2,82 respectivamente. En estudios anteriores, nuestro grupo de investigación informó una CL₅₀ de 4,17 $\mu\text{g L}^{-1}$, CE₅₀ de 1,39 $\mu\text{g L}^{-1}$ y

IT de 3,0 después de la exposición a concentraciones ambientalmente relevantes de IBU (1,5-11,5 $\mu\text{g L}^{-1}$) en ovocitos de carpa común (Gutiérrez-Noya et al., 2020). Además, Luján-Mondragón et al., (2019) reportaron una CL_{50} de 5,65%, CE_{50} de 3,85% $\mu\text{g L}^{-1}$ y IT de 1,46 a 96 hpf debido a la exposición a un efluente hospitalario que contenía AINE's entre otros productos farmacéuticos en la misma especie. Con base en el valor de IT calculado para IBU 2,82, esta sustancia puede clasificarse como potencialmente teratogénica, sin embargo, el valor de IT no considera las curvas de concentración-respuesta o la proporción de organismos con efectos letales y teratogénicos, por lo tanto, es una estimación del potencial teratogénico de una sustancia. En ese sentido resulta indispensable realizar una serie de observaciones y mediciones meticulosas de varias características morfológicas como las determinadas en este estudio, para llevar a cabo una evaluación fiable de la toxicidad de un compuesto (Weigt et al., 2011).

En el presente estudio, los efectos teratogénicos promovidos por IBU en embriones de *D. rerio*, como alteraciones de la eclosión, malformaciones esqueléticas y deterioro cardíaco, muestran que este AINE tiene el potencial de inducir malformaciones importantes a concentraciones ambientalmente relevantes. Se han identificado diferentes mecanismos de acción embriotóxica tras la exposición a este compuesto farmacéutico. Las sustancias pro-teratógenas pueden activarse biológicamente mediante oxidación a metabolitos tóxicos como moléculas electrofílicas o subproductos de radicales libres debido a un fenómeno denominado estrés oxidativo (OS) (Wells et al., 2005).

El estrés oxidativo se considera un desequilibrio entre las especies prooxidantes y las defensas antioxidantes debido a cambios en el entorno intracelular normal de REDOX (Abdelkhalek & Ghazy, 2014; Ganesan et al., 2016). Este mecanismo se ha asociado con un amplio espectro de defectos congénitos, que incluyen aberraciones esqueléticas, alteraciones cardiovasculares y retrasos en el desarrollo embrionario (Laher, 2014; Pašková et al., 2011). Se ha reconocido en

gran medida que las especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y azufre influyen en la activación transcripcional de genes implicados en la regulación de las actividades celulares, por lo que desempeñan un papel esencial en el desarrollo de los vertebrados (Covarrubias et al., 2008; Mugoni et al., 2014; Paulsen & Carroll, 2013). Los cambios en el sistema redox se han relacionado con efectos nocivos durante el desarrollo embrionario y malformaciones graves en las especies de peces, como se observa en el presente estudio (Wells et al., 2005). Además, la biotransformación de IBU en subproductos electrofílicos como 2-OH-IBU, *p*-benzoquinonas y acil glucurónidos derivados de IBU pueden provocar daño oxidativo en biomoléculas debido a la formación indirecta de ROS a través del ciclo redox en vertebrados superiores (Barata et al., 2005; Boelsterli, 2003). Además, nuestros resultados pueden explicarse por el MOA de los AINE, implicados en la inhibición del sistema ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2), un grupo de enzimas que catalizan un paso clave en la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas (PGH₂) (Brauch et al., 2012). La embriogénesis se ve fuertemente afectada por la síntesis de prostaglandinas y la señalización de la ciclooxigenasa (Cha et al., 2006). Se ha considerado que los prostanoides participan activamente en el ciclo reproductivo, la homeostasis cardiovascular, el desarrollo de los vasos sanguíneos, el desarrollo de los riñones y la condro y osteogénesis (Peltzer et al., 2019). La inhibición de la señalización de la ciclooxigenasa después del período de gastrulación da como resultado la formación defectuosa del tubo vascular, alteraciones en los vasos intersómicos en la región posterior del cuerpo, detención del crecimiento, defectos esqueléticos y malformación del conducto nefrítico en embriones de pez cebra (Cha et al., 2006). En el presente estudio, se observó un retraso en el proceso de eclosión a 72 hpf. Antes de eclosionar, el corion inicia un proceso de ablandamiento debido a la actividad proteolítica de la enzima corionasa potenciando la permeabilidad y aumentando así la adsorción de diferentes sustancias del entorno (Tenorio-Chávez et al., 2020). Las alteraciones en el proceso de eclosión pueden deberse a la actividad

inhibida de la corionasa, alteraciones osmóticas que afectan la actividad proteolítica de la enzima, consumo elevado de oxígeno durante la fase de hinchamiento y alteraciones del comportamiento que resultan en movimientos reducidos necesarios para la rotura mecánica de la membrana. con la cola (Haendel et al., 2004; Strmac, 2002). Además, el deterioro de la frecuencia cardíaca observado para las concentraciones más altas de IBU puede deberse a la inhibición de la expresión de COX-1 y, por lo tanto, a la vía de señalización de prostaglandinas durante el desarrollo de la vasculatura, la diferenciación arterovenosa y el proceso de angiogénesis que controlan la homeostasis cardiovascular (Cha et al., 2006).

Asimismo, la alteración de la frecuencia cardíaca puede considerarse como un efecto secundario a la formación de edema pericárdico debido a la compresión mecánica que afecta la circulación sanguínea y presuntamente genera alteraciones en la morfología cardíaca (Antkiewicz et al., 2005). En general, nuestros resultados son consistentes con otros autores que refirieron que el IBU genera casos severos de escoliosis, malformaciones de notocorda y cola, edema pericárdico, retraso en el desarrollo, defecto de la aleta pectoral, disminución de la frecuencia cardíaca y alteraciones del comportamiento en *D. rerio* y *C. carpio* en concentraciones entre 1.5-100 µg L⁻¹ (David y Pancharatna, 2009; Gutiérrez-Noya et al., 2020).

Por otro lado, los metales pesados inducen alteraciones en el proceso de eclosión, anomalías del desarrollo durante la fase de organogénesis y una disminución en la supervivencia de las larvas eclosionadas (Jeziarska et al., 2009). Los resultados de embrioletalidad encontrados en este estudio demuestran que la exposición a Al en concentraciones ambientalmente relevantes y concentraciones consideradas seguras para la protección de la vida acuática (SEDUE, 1989) ha demostrado ser tóxica para los ovocitos de *D. rerio*. La CL₅₀, CE₅₀ y IT de 5.0 mg L⁻¹, 3.85 mg L⁻¹ y 1.39 respectivamente, muestran que este metal puede clasificarse como un compuesto teratogénico con un fuerte carácter embrioletal (Lee et al., 2013; Weigt et al., 2011). El aluminio se

considera no esencial para la biota, su biodisponibilidad se ve afectada por los parámetros fisicoquímicos del medio acuático (Santore et al., 2018; Trenfield et al., 2012b). Se sabe que, debido a su estado estable de oxidación, este metal no tiene actividad redox en sistemas biológicos, sin embargo, se considera un ion pro-oxidante fuerte (Abreo et al., 2004; Fernández-Dávila et al., 2012b) capaz de romper metabolismo ion-metal que promueve la reacción de Fenton y conduce a la oxidación de las principales biomoléculas (J. I. Mujika et al., 2011; Yousef, 2004). Diversos estudios reportan que los peces teleósteos adultos son capaces de bioacumular el metal después de la exposición (Oberholster et al., 2012b; Sivakumar et al., 2012; Voigt et al., 2015). Gopalakrishnan et al., (2008) informaron sobre la capacidad de los ovocitos y las larvas de bioacumular metales pesados. Se ha demostrado que el corion no es capaz de proteger completamente al embrión contra la penetración de iones metálicos, principalmente durante el hinchamiento del huevo, por lo que es posible la acumulación de metal en los ovocitos (Jeziarska et al., 2009). Los resultados de las malformaciones identificadas en este estudio se pueden explicar por una serie de mecanismos de toxicidad ya descritos para Al en diferentes organismos acuáticos (Fernández-Dávila et al., 2012b; García-Medina et al., 2010b; Quiroga-Santos et al., 2021). Se sabe que este metal deteriora las funciones celulares al alterar la estructura de las proteínas debido a su alta afinidad por los grupos sulfhidrilo que se encuentran en las proteínas que poseen grupos amino que contienen azufre como la cisteína (Khan et al., 2013). Una vez que el Al penetra en el corion, puede unirse a los grupos tiol de proteínas e inducir la formación de especies radicales, responsables de efectos embriotóxicos en varios organismos acuáticos (Adeyemi et al., 2015; Ganesan et al., 2016). Asimismo, García-Medina et al., (2010) y Hasan et al., (2018) reportaron que este metal es capaz de afectar el transporte de electrones en la cadena respiratoria como resultado del daño directo a las mitocondrias e interactuar de manera directa e indirecta con diversas proteínas y enzimas esenciales para varios procesos biológicos, así como

funciones moleculares en diferentes organismos. Además, las anomalías esqueléticas, principalmente las malformaciones craneofaciales y de la cola encontradas en el presente estudio, pueden explicarse porque el Al es capaz de acumularse en los huesos, ya que desplaza el calcio en la superficie ósea, lo que provoca aberraciones en la mineralización, hipercalcemia, hipercalciuria y osteomalacia que afectan la actividad cardíaca, nerviosa. y osteogénesis en embriones a través de la inhibición de la vía de señalización Wnt / β -catenina que promueve malformaciones axiales como escoliosis, cifosis y lordosis (Brannen et al., 2010; Klein, 2019; Song et al., 2018; Sun et al., 2017). Se puede especular que la reducción en la tasa de eclosión observada en el presente estudio es el resultado de la interacción del aluminio con la enzima corionasa, una metaloproteasa denominada proteasa de eclosión (Scheil et al., 2009).

También se observó hipopigmentación en embriones expuestos a Al. Se ha reportado que los metales generan una disminución en la expresión de genes clave involucrados en la formación de la cresta neural, estructura de la cual se derivan neuronas periféricas, glía, elementos del esqueleto craneofacial y células pigmentarias (Rocha et al., 2020). El adecuado desarrollo y mantenimiento de la cresta neural se ha asociado con la señalización del ácido retinoico (Chawla et al., 2018). El ácido retinoico (RA) es un factor poderoso durante la embriogénesis, principalmente durante la gastrulación y posterior organogénesis, ya que participa en el crecimiento, diferenciación y morfología de diversas células (Kawakami et al., 2005). Las alteraciones en su señalización causadas por Al se asocian con malformaciones del sistema esquelético, ocular, SNC y cardiovascular (Szutowicz et al., 2015). Nuestro estudio es consistente con Tle et al., (2012) quienes encontraron que la privación temprana de AR resultó en una deficiencia de células pigmentadas en los ojos de los embriones de pez cebra. Por otro lado, la frecuencia de los latidos del corazón se redujo en los embriones expuestos a Al después de 72 hpf. Se han identificado dos objetivos principales para la acción tóxica del Al, los sistemas nervioso

y circulatorio (Monaco et al., 2017). Se han identificado varios mecanismos de alteraciones cardiovasculares provocadas por el aluminio, entre ellos la toxicidad directa sobre miocitos cardíacos, inhibición de la enzima citocromo C oxidasa, pérdida excesiva de líquidos, toxicidad de la glándula suprarrenal, estrés oxidativo, deterioro de la actividad mitocondrial y procesos de apoptosis, entre otros (Asghari et al., 2016; Mohan et al., 2015). En concordancia con el presente estudio, Monaco et al., (2017) reportaron la presencia de edema pericárdico y frecuencia cardíaca alterada en embriones de pez cebra después de la exposición a 100 mM de Al.

En el caso de mezclas de xenobióticos con distintos MOA específicos, pueden ocurrir interacciones y cualquier variación en los biomarcadores evaluados se debe a alteraciones de sus mecanismos de toxicidad (Luja-Mondragón et al., 2019; Pérez-Alvarez et al., 2018). Así, los resultados obtenidos tras la exposición a la mezcla consistente en los valores de CE50 de ambas sustancias muestran que el número de organismos muertos y malformados fue superior al 50% del total de embriones evaluados y los efectos teratogénicos detectados fueron múltiples y relativamente más graves que los observados en las formas aisladas. Las malformaciones más frecuentes detectadas después de la exposición a la mezcla fueron retrasos en la eclosión, defectos axiales que incluyen alteraciones de la cola, cabeza y cuerdas, edema pericárdico, hipopigmentación y retraso en el desarrollo, así como deterioro cardíaco. Se pueden considerar efectos sinérgicos cuando el efecto de la exposición a una mezcla parece ser mayor o distinto al esperado por la respuesta aditiva, por otro lado, el antagonismo se genera cuando uno o varios compuestos que participan en una mezcla interfieren con la acción de otros, por lo que hay una disminución en el efecto previsto de cada compuesto con estructuras similares o diferentes (López González et al., 2019; Quiroga-Santos et al., 2021). Los valores de interacción aditiva de la frecuencia de malformaciones (**Tabla 6**) mostraron que el retraso del desarrollo, la hipopigmentación y la malformación de la cabeza

exhibieron efectos sinérgicos con respecto a los valores reales obtenidos después de la exposición a la mezcla. Por el contrario, los criterios de valoración como los defectos de la cuerda y la cola, el retraso de la eclosión, el edema pericárdico, llevaron a resultados significativamente más bajos como indicativos de un efecto antagonista de ambas sustancias. Sin embargo, la observación cualitativa de los embriones y larvas mostró que a pesar de que la frecuencia de malformaciones fluctuaba en comparación con las formas aisladas, las alteraciones del desarrollo inducidas por la mezcla parecen ser más severas en todos los puntos finales evaluados poniendo en riesgo la vida de los organismos. Los resultados de nuestro estudio concuerdan con otros estudios que evalúan efluentes hospitalarios que contienen mezclas de productos farmacéuticos y metales, donde se presentan malformaciones graves como microcefalia, daño a la notocorda, cola, aleta e intestino, así como alteraciones de la eclosión, edema pericárdico, malformaciones axiales y retraso. en el desarrollo se han reportado en *X. laevis* y *D. rerio* respectivamente (Pérez-Alvarez et al., 2018; Tenorio-Chávez et al., 2020).

10. Conclusiones.

Los contaminantes del agua nunca están presentes de forma aislada en el medio ambiente, por el contrario forman parte de mezclas complejas que en la mayoría de los casos mantienen sus propias características químicas promoviendo una serie de mecanismos de toxicidad conjunta poco conocidos hasta el día de hoy. Las vías de toxicidad general para muchos contaminantes ambientales están mediadas principalmente por el aumento de especies reactivas de oxígeno intracelulares y el agotamiento de la defensa antioxidante con el consiguiente estrés oxidativo y oxidación de biomoléculas celulares. La exposición subcrónica a las concentraciones ambientales de IBU y Al puede representar un peligro considerable para *D. rerio* en edad adulta. Los tratamientos con IBU parecen inducir un aumento de las especies reactivas de oxígeno con el

consiguiente aumento del estado de estrés oxidativo principalmente en las branquias, el hígado y el intestino del pez cebra. Las vías mediadas químicamente tienen el potencial de aumentar considerablemente la formación de especies de radicales como ROS y RSN a nivel intracelular y, simultáneamente, niveles excesivos de radicales de oxígeno podrían alterar el metabolismo de los xenobióticos, con importantes consecuencias para los organismos expuestos a mezclas químicas (Regoli y Giuliani, 2014). Los efectos inducidos son mayores en las muestras expuestas a mezclas binarias que en aquellas expuestas a formas aisladas de tóxicos evaluados, y es posible inferir que las interacciones de potenciación ocurren entre IBU y Al, mientras que las interacciones antagonistas ocurren en biomarcadores antioxidantes en comparación con las interacciones aditivas. De igual forma el ibuprofeno y el aluminio, en concentraciones ambientalmente relevantes, actúan como agentes embriotóxicos y teratogénicos en *D. rerio*. La respuesta tóxica de la mezcla fue diferente en número y gravedad en comparación con las formas aisladas. Las vías de toxicidad general de muchos contaminantes ambientales están mediadas principalmente a través de interacciones, ya que ninguna sustancia se encuentra aislada en el medio ambiente, por lo que el estudio de mezclas complejas puede considerarse relevante. En este estudio, los diferentes mecanismos de toxicidad de IBU y Al, incluido el estrés oxidativo, condujeron a varios patrones de malformaciones, por lo que, además de la determinación de la potencia embriotóxica, la identificación de anomalías morfológicas y bioquímicas es una herramienta útil para dilucidar aún más los mecanismos de embriotoxicidad. Este estudio tuvo como objetivo resaltar la importancia de investigar los posibles efectos ambientales que pueden surgir cuando los principios activos farmacéuticos y los microcontaminantes de otras fuentes convergen e interactúan en los sistemas acuáticos.

11. Referencias.

- Abdalla, R. P., Kida, B. M. S., Pinheiro, J. P. S., Oliveira, L. F., Martinez, C. B. F., & Moreira, R. G. (2019). Exposure to aluminum, aluminum + manganese and acid pH triggers different antioxidant responses in gills and liver of *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes: Characidae) males. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 215(September 2018), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.09.004>
- Abdelkhalek, N. K. M., & Ghazy, E. W. (2014). *Pharmacodynamic interaction of Spirulina platensis and deltamethrin in freshwater fish Nile tilapia, Oreochromis niloticus: impact on lipid peroxidation and oxidative stress*. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3578-0>
- Abdollahi, M., Mostafalou, S., Pournourmohammadi, S., & Shadnia, S. (2004). Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 137(1), 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2003.11.002>
- Abreo, K., Sella, M., Alvarez-Hernandez, X., & Jain, S. (2004). Antioxidants prevent aluminum-induced toxicity in cultured hepatocytes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(6), 1129–1134. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.03.012>
- Adeyemi, J. A., Da Cunha Martins, A., & Barbosa, F. (2015). Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to arsenic and atrazine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 172–173, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.04.001>
- Al Aukidy, M., Verlicchi, P., Jelic, A., Petrovic, M., & Barcelò, D. (2012). Monitoring release of pharmaceutical compounds: Occurrence and environmental risk assessment of two WWTP

- effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. *Science of the Total Environment*, 438, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.061>
- Allin, C. J., & Wilson, R. W. (2000). Effects of pre-acclimation to aluminium on the physiology and swimming behaviour of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during a pulsed exposure. *Aquatic Toxicology*, 51(2), 213–224. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00111-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00111-9)
- Álvarez Garzón, C. (2011). *Efectos teratogénicos del nitrato de plomo en el desarrollo embrionario del pez cebra danio rerio (Hamilton, 1822) a cinco dosis subletales*. 1–46. <http://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8844>
- Anandhan, R., & Hemalatha, S. (2009). Bioaccumulation of aluminium in selected tissues of zebra fish *Brachydanio rerio* (Ham.). *Nature Environment and Pollution Technology*, 8(4), 751–753.
- Antkiewicz, D. S., Burns, C. G., Carney, S. A., Peterson, R. E., & Heideman, W. (2005). Heart malformation is an early response to TCDD in embryonic zebrafish. *Toxicological Sciences*, 84(2), 368–377. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi073>
- Asensio, C., Levoín, N., Guillaume, C., Guérquin, M. J., Rouguieg, K., Chrétien, F., Chapleur, Y., Netter, P., Minn, A., & Lapique, F. (2007). Irreversible inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase by the coenzyme A conjugate of ketoprofen: A key to oxidative stress induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs? *Biochemical Pharmacology*, 73(3), 405–416. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.09.026>
- Asghari, A., Fazilati, M., Latifi, A. M., & Salavati, H. (2016). *A Review on Antioxidant Properties of Spirulina*. 3(1).

- Ashraf, W. (2005). Accumulation of heavy metals in kidney and heart tissues of *Epinephelus* Micrdon fish from the Arabian Gulf. *Environmental Monitoring and Assessment*, 101(1–3), 311–316. <https://doi.org/10.1007/s10661-005-0298-4>
- Authman, M. M. (2015). Use of Fish as Bio-indicator of the Effects of Heavy Metals Pollution. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 06(04). <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000328>
- Bagnyukova, T. V, Chahrak, O. I., & Lushchak, V. I. (2006). *Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress*. 78, 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.04.005>
- Bakr, A. R., & Rahaman, M. S. (2019). Crossflow electrochemical filtration for elimination of ibuprofen and bisphenol a from pure and competing electrolytic solution conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 365, 615–621. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.11.015>
- Bally, M., Dendukuri, N., Rich, B., Nadeau, L., Helin-Salmivaara, A., Garbe, E., & Brophy, J. M. (2017). Risk of acute myocardial infarction with NSAIDs in real world use: Bayesian meta-analysis of individual patient data. *BMJ (Online)*, 357(Cox 2). <https://doi.org/10.1136/bmj.j1909>
- Barata, C., Varo, I., Navarro, J. C., Arun, S., & Porte, C. (2005). Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 140(2), 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.01.013>
- Barrera-escorcia, G. (2004). Contaminación microbiológica en la zona costera de Akumal, Quintana Roo, México. *Hidrobiológica*, 14(1), 27–35.

- Bartoskova, M., Dobsikova, R., Stancova, V., Zivna, D., Blahova, J., Marsalek, P., Zelnickova, L., Bartos, M., Casuscelli, F., Faggio, C., & Bartoskova, M. (2013). *zebrafish (Danio rerio) targeting on A R T I C L E*. 34, 102–108.
- Bendz, D., Paxéus, N. A., Ginn, T. R., & Loge, F. J. (2005). Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials*, 122(3), 195–204.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.03.012>
- Bhandari, K., & Venables, B. (2011). Ibuprofen bioconcentration and prostaglandin E2 levels in the bluntnose minnow *Pimephales notatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 153(2), 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.11.004>
- Bjarnason, I., Scarpignato, C., Holmgren, E., Olszewski, M., Rainsford, K. D., & Lanas, A. (2018). Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Gastroenterology*, 154(3), 500–514. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.10.049>
- Blanco, G., Martínez, C., García-Martín, E., & Agúndez, J. A. G. (2005). Cytochrome P450 gene polymorphisms and variability in response to NSAIDs. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, 22(2), 57–81. <https://doi.org/10.1080/10601330500214559>
- Boelsterli, U. A. (2003). Diclofenac-induced liver injury: A paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192(3), 307–322. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(03\)00368-5](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(03)00368-5)
- Bonanno, G., & Orlando-Bonaca, M. (2018). Perspectives on using marine species as bioindicators of plastic pollution. *Marine Pollution Bulletin*, 137(September), 209–221.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.10.018>

- Bondy, S. C. (2010). The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue. *NeuroToxicology*, 31(5), 575–581. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.05.009>
- Brannen, K. C., Panzica-Kelly, J. M., Danberry, T. L., & Augustine-Rauch, K. A. (2010). Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*, 89(1), 66–77. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20223>
- Brausch, J. M., Connors, K. A., Brooks, B. W., & Rand, G. M. (2012). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 218* (Vol. 218). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3137-4>
- Brown, J. N., Paxéus, N., Förlin, L., & Larsson, D. G. J. (2007). Variations in bioconcentration of human pharmaceuticals from sewage effluents into fish blood plasma. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24(3), 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2007.06.005>
- Brugman, S. (2016). The zebrafish as a model to study intestinal inflammation. *Developmental and Comparative Immunology*, 64, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.02.020>
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52(C), 302–310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Cardwell, A. S., Adams, W. J., Gensemer, R. W., Nordheim, E., Santore, R. C., Ryan, A. C., & Stubblefield, W. A. (2018a). Chronic toxicity of aluminum, at a pH of 6, to freshwater organisms: Empirical data for the development of international regulatory standards/criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(1), 36–48. <https://doi.org/10.1002/etc.3901>
- Cardwell, A. S., Adams, W. J., Gensemer, R. W., Nordheim, E., Santore, R. C., Ryan, A. C., & Stubblefield, W. A. (2018b). Chronic toxicity of aluminum, at a pH of 6, to freshwater

- organisms: Empirical data for the development of international regulatory standards/criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(1), 36–48. <https://doi.org/10.1002/etc.3901>
- Carmona, E., Andreu, V., & Picó, Y. (2014). Occurrence of acidic pharmaceuticals and personal care products in Turia River Basin: From waste to drinking water. *Science of the Total Environment*, 484(1), 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.085>
- Cha, Y. I., Solnica-Krezel, L., & DuBois, R. N. (2006). Fishing for prostanoids: Deciphering the developmental functions of cyclooxygenase-derived prostaglandins. *Developmental Biology*, 289(2), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.10.013>
- Chabukdhara, M., & Nema, A. K. (2012). Assessment of heavy metal contamination in Hindon River sediments: A chemometric and geochemical approach. *Chemosphere*, 87(8), 945–953. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.055>
- Chawla, B., Swain, W., Williams, A. L., & Bohnsack, B. L. (2018). Retinoic acid maintains function of neural crest–derived ocular and craniofacial structures in adult zebrafish. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 59(5), 1924–1935. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-22845>
- Choe, K. P., Havird, J., Rose, R., Hyndman, K., Piermarini, P., & Evans, D. H. (2006). COX2 in a euryhaline teleost, *Fundulus heteroclitus*: Primary sequence, distribution, localization, and potential function in gills during salinity acclimation. *Journal of Experimental Biology*, 209(9), 1696–1708. <https://doi.org/10.1242/jeb.02198>
- Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59(3), 309–315. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00141-6](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00141-6)

- Covarrubias, L., Hernández-García, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E., & Castro-Obregón, S. (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? *Developmental Biology*, 320(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.041>
- Coz, A., Andrés, A., & Irabien, A. (2004). Ecotoxicity Assessment of Stabilized/Solidified Foundry Sludge. *Environmental Science and Technology*, 38(6), 1897–1900. <https://doi.org/10.1021/es034913f>
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329(1–2), 23–38. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2)
- De Noronha, A. L. O., Guimarães, L., & Duarte, H. A. (2007). Structural and thermodynamic analysis of the first mononuclear aqueous aluminum citrate complex using DFT calculation. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 3(3), 930–937. <https://doi.org/10.1021/ct700016f>
- DeForest, D. K., Brix, K. V., Tear, L. M., & Adams, W. J. (2018a). Multiple linear regression models for predicting chronic aluminum toxicity to freshwater aquatic organisms and developing water quality guidelines. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(1), 80–90. <https://doi.org/10.1002/etc.3922>
- DeForest, D. K., Brix, K. V., Tear, L. M., & Adams, W. J. (2018b). Multiple linear regression models for predicting chronic aluminum toxicity to freshwater aquatic organisms and developing water quality guidelines. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(1), 80–90. <https://doi.org/10.1002/etc.3922>
- Dehay, B., & Bezard, E. (2011). New animal models of Parkinson's disease. *Movement*

Disorders, 26(7), 1198–1205. <https://doi.org/10.1002/mds.23546>

Dennery, P. A. (2007). Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 81(3), 155–162.
<https://doi.org/10.1002/bdrc.20098>

Di Baccio, D., Pietrini, F., Bertolotto, P., Pérez, S., Barcelò, D., Zacchini, M., & Donati, E. (2017). Response of *Lemna gibba* L. to high and environmentally relevant concentrations of ibuprofen: Removal, metabolism and morpho-physiological traits for biomonitoring of emerging contaminants. *Science of the Total Environment*, 584–585, 363–373.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.191>

Doi, H., Iwasaki, H., Masubuchi, Y., Nishigaki, R., & Horie, T. (2002). Chemiluminescence associated with the oxidative metabolism of salicylic acid in rat liver microsomes. *Chemico-Biological Interactions*, 140(2), 109–119. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(02\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00004-2)

Dzulfakar, M. A., Shaharuddin, M. S., Muhaimin, A. A., & Syazwan, A. I. (2011). Risk assessment of aluminum in drinking water between two residential areas. *Water (Switzerland)*, 3(3), 882–893. <https://doi.org/10.3390/w3030882>

Edokpayi, J. N., Enitan, A. M., Mutileni, N., & Odiyo, J. O. (2018). Evaluation of water quality and human risk assessment due to heavy metals in groundwater around Muledane area of Vhembe District, Limpopo Province, South Africa. *Chemistry Central Journal*, 12(1), 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s13065-017-0369-y>

El Azhari, A., Rhoujjati, A., El Hachimi, M. L., & Ambrosi, J. paul. (2017). Pollution and ecological risk assessment of heavy metals in the soil-plant system and the sediment-water column around a former Pb/Zn-mining area in NE Morocco. *Ecotoxicology and Environmental*

Safety, 144(March), 464–474. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.051>

Engbers, A. G. J., Flint, R. B., Völler, S., de Klerk, J. C. A., Reiss, I. K. M., Andriessen, P., Liem, K. D., Degraeuwe, P. L. J., Croubels, S., Millegam, J., Allegaert, K., Simons, S. H. P., & Knibbe, C. A. J. (2020). Enantiomer specific pharmacokinetics of ibuprofen in preterm neonates with patent ductus arteriosus. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 86(10), 2028–2039. <https://doi.org/10.1111/bcp.14298>

EPA. (2017). *Draft Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria for Aluminium - EPA-822-P-17-001*. July, 1–3.

Epa, U. S. (2011). *Draft Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria for*. October.

Escher, B. I., Bramaz, N., Eggen, R. I. L., & Richter, M. (2005). In vitro assessment of modes of toxic action of pharmaceutical in aquatic life. *Environmental Science and Technology*, 39(9), 3090–3100. <https://doi.org/10.1021/es048590e>

Esparza, J. L., Garcia, T., Gómez, M., Nogués, M. R., Giralt, M., & Domingo, J. L. (2011). Role of deferoxamine on enzymatic stress markers in an animal model of Alzheimer's disease after chronic aluminum exposure. *Biological Trace Element Research*, 141(1–3), 232–245. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8715-0>

Estévez, M., Kylli, P., Puolanne, E., Kivikari, R., & Heinonen, M. (2008). Oxidation of skeletal muscle myofibrillar proteins in oil-in-water emulsions: interaction with lipids and effect of selected phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22), 10933–10940. <https://doi.org/10.1021/jf801784h>

Evans, D. H., Piermarini, P. M., & Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste.

Physiological Reviews, 85(1), 97–177. <https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2003>

Farré, M. la, Pérez, S., Kantiani, L., & Barceló, D. (2008). Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 27(11), 991–1007. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.09.010>

Félix-Cañedo, T. E., Durán-Álvarez, J. C., & Jiménez-Cisneros, B. (2013). The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. *Science of the Total Environment*, 454–455, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.088>

Ferdin, J., & Halili, A. (2017). *The zebrafish embryo toxicity and teratogenicity assay. February*.

Fernández-Dávila, M. L., Razo-Estrada, A. C., García-Medina, S., Gómez-Oliván, L. M., Piñón-López, M. J., Ibarra, R. G., & Galar-Martínez, M. (2012a). Aluminum-induced oxidative stress and neurotoxicity in grass carp (Cyprinidae-Ctenopharingodon idella). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 76(1), 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.012>

Fernández-Dávila, M. L., Razo-Estrada, A. C., García-Medina, S., Gómez-Oliván, L. M., Piñón-López, M. J., Ibarra, R. G., & Galar-Martínez, M. (2012b). Aluminum-induced oxidative stress and neurotoxicity in grass carp (Cyprinidae-Ctenopharingodon idella). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 76(1), 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.012>

Ferrando-Climent, L., Collado, N., Buttiglieri, G., Gros, M., Rodríguez-Roda, I., Rodríguez-Mozaz, S., & Barceló, D. (2012). Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 438, 404–413. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.08.073>

Flippin, J. L., Huggett, D., & Foran, C. M. (2007). Changes in the timing of reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Aquatic Toxicology*,

81(1), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.11.002>

Fritz, K. S., & Petersen, D. R. (2011). Exploring the biology of lipid peroxidation-derived protein carbonylation. *Chemical Research in Toxicology*, 24(9), 1411–1419.

<https://doi.org/10.1021/tx200169n>

Ganesan, S., Anaimalai Thirumurthi, N., Raghunath, A., Vijayakumar, S., & Perumal, E. (2016). Acute and sub-lethal exposure to copper oxide nanoparticles causes oxidative stress and teratogenicity in zebrafish embryos. *Journal of Applied Toxicology*, 36(4), 554–567.

<https://doi.org/10.1002/jat.3224>

García-Medina, S., Angélica Núñez-Betancourt, J., Lucero García-Medina, A., Galar-Martínez, M., Neri-Cruz, N., Islas-Flores, H., & Manuel Gómez-Oliván, L. (2013). The relationship of cytotoxic and genotoxic damage with blood aluminum levels and oxidative stress induced by this metal in common carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 96, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.06.010>

García-Medina, S., Razo-Estrada, A. C., Gómez-Oliván, L. M., Amaya-Chávez, A., Madrigal-Bujaidar, E., & Galar-Martínez, M. (2010a). Aluminum-induced oxidative stress in lymphocytes of common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(4), 875–882. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9363-1>

García-Medina, S., Razo-Estrada, A. C., Gómez-Oliván, L. M., Amaya-Chávez, A., Madrigal-Bujaidar, E., & Galar-Martínez, M. (2010b). Aluminum-induced oxidative stress in lymphocytes of common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(4), 875–882. <https://doi.org/10.1007/s10695-009-9363-1>

García-Medina, S., Razo-Estrada, C., Galar-Martínez, M., Cortéz-Barberena, E., Gómez-Oliván,

- L. M., Álvarez-González, I., & Madrigal-Bujaidar, E. (2011). Genotoxic and cytotoxic effects induced by aluminum in the lymphocytes of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 153(1), 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.09.005>
- Gentile, F., Arcaro, A., Pizzimenti, S., Daga, M., Paolo Cetrangolo, G., Dianzani, C., Lepore, A., Graf, M., R. J. Ames, P., & Barrera, G. (2017). DNA damage by lipid peroxidation products: implications in cancer, inflammation and autoimmunity. *AIMS Genetics*, 4(2), 103–137. <https://doi.org/10.3934/genet.2017.2.103>
- Ginebreda, A., Muñoz, I., de Alda, M. L., Brix, R., López-Doval, J., & Barceló, D. (2010). Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). *Environment International*, 36(2), 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.10.003>
- Gil, F. (2000) El papel de los biomarcadores en Toxicología humana. *Rev Tox.*, 17(1) ,19-26.
- Goldsmith, J. R., Cocchiaro, J. L., Rawls, J. F., & Jobin, C. (2013). Glafenine-induced intestinal injury in zebrafish is ameliorated by μ -opioid signaling via enhancement of Atf6-dependent cellular stress responses. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 6(1), 146–159. <https://doi.org/10.1242/dmm.009852>
- Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Valdés-Alanís, A., Islas-Flores, H., & Neri-Cruz, N. (2014a). Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug and Chemical Toxicology*, 37(4), 391–399. <https://doi.org/10.3109/01480545.2013.870191>
- Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Valdés-Alanís, A., Islas-Flores, H.,

& Neri-Cruz, N. (2014b). Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug and Chemical Toxicology*, 37(4), 391–399. <https://doi.org/10.3109/01480545.2013.870191>

Gómez-Oliván, L. M., Mendoza-Zenil, Y. P., SanJuan-Reyes, N., Galar-Martínez, M., Ramírez-Durán, N., Rodríguez Martín-Doimeadios, R. del C., Rodríguez-Fariñas, N., Islas-Flores, H., Elizalde-Velázquez, A., García-Medina, S., & Pérez-Pastén Borja, R. (2017). Geno- and cytotoxicity induced on *Cyprinus carpio* by aluminum, iron, mercury and mixture thereof. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 135, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.09.037>

Gómez-Oliván, L. M., Neri-Cruz, N., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., & García-Medina, S. (2014). Binary mixtures of diclofenac with paracetamol, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid and these pharmaceuticals in isolated form induce oxidative stress on *Hyaella azteca*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(11), 7259–7271. <https://doi.org/10.1007/s10661-014-3925-0>

Gomez, C. F., Constantine, L., Moen, M., Vaz, A., Wang, W., & Huggett, D. B. (2011). Ibuprofen metabolism in the liver and gill of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86(3), 247–251. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0200-8>

González-Alonso, S., Merino, L. M., Esteban, S., López de Alda, M., Barceló, D., Durán, J. J., López-Martínez, J., Aceña, J., Pérez, S., Mastroianni, N., Silva, A., Catalá, M., & Valcárcel, Y. (2017). Occurrence of pharmaceutical, recreational and psychotropic drug residues in surface water on the northern Antarctic Peninsula region. *Environmental Pollution*, 229, 241–254. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.060>

González-González, E. D., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., Vieyra-Reyes, P., Islas-Flores, H., García-Medina, S., Jiménez-Vargas, J. M., Razo-Estrada, C., & Pérez-Pastén, R. (2014a). Metals and nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceuticals drugs present in water from Madín Reservoir (Mexico) induce oxidative stress in gill, blood, and muscle of common carp (*Cyprinus carpio*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 67(2), 281–295. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0048-0>

González-González, E. D., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., Vieyra-Reyes, P., Islas-Flores, H., García-Medina, S., Jiménez-Vargas, J. M., Razo-Estrada, C., & Pérez-Pastén, R. (2014b). Metals and nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceuticals drugs present in water from Madín Reservoir (Mexico) induce oxidative stress in gill, blood, and muscle of common carp (*Cyprinus carpio*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 67(2), 281–295. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0048-0>

Gonzalez-Rey, M., & Bebianno, M. J. (2012a). Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 33(2), 361–371. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.12.017>

Gonzalez-Rey, M., & Bebianno, M. J. (2012b). Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 33(2), 361–371. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.12.017>

Gonzalez-Rey, M., & Bebianno, M. J. (2014). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 148, 818–831. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.011>

- Gonzler, W. a. (1984). LEOPOLD FLOHI~ and WOLFGANG A. GONZLER The term glutathione peroxidase (glutathione: H₂O₂ oxidoreductase, EC 1.11.1.9) is reserved for the selenoprotein catalyzing the reaction: *Health (San Francisco)*, 105, 114–120.
- Gopalakrishnan, S., Thilagam, H., & Raja, P. V. (2008). Comparison of heavy metal toxicity in life stages (spermiotoxicity, egg toxicity, embryotoxicity and larval toxicity) of *Hydroides elegans*. *Chemosphere*, 71(3), 515–528.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.09.062>
- Gorito, A. M., Ribeiro, A. R., Almeida, C. M. R., & Silva, A. M. T. (2017). A review on the application of constructed wetlands for the removal of priority substances and contaminants of emerging concern listed in recently launched EU legislation. *Environmental Pollution*, 227, 428–443. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.060>
- Grassie, C., Braithwaite, V. A., Nilsson, J., Nilsen, T. O., Teien, H. C., Handeland, S. O., Stefansson, S. O., Tronci, V., Gorissen, M., Flik, G., & Ebbesson, L. O. E. (2013). Aluminum exposure impacts brain plasticity and behavior in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Experimental Biology*, 216(16), 3148–3155. <https://doi.org/10.1242/jeb.083550>
- Gravel, A., Wilson, J. M., Pedro, D. F. N., & Vijayan, M. M. (2009). Non-steroidal anti-inflammatory drugs disturb the osmoregulatory, metabolic and cortisol responses associated with seawater exposure in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 149(4), 481–490.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.11.002>
- Griffitt, R. J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J. C., & Barber, D. S. (2008). Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9), 1972–1978. <https://doi.org/10.1897/08->

002.1

- Grzesiuk, M., Pijanowska, J., Markowska, M., & Bednarska, A. (2020). Morphological deformation of *Daphnia magna* embryos caused by prolonged exposure to ibuprofen. *Environmental Pollution*, 261, 114135. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114135>
- Guéraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P. M., Huc, L., Jouanin, I., Siems, W., & Uchida, K. (2010). Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radical Research*, 44(10), 1098–1124. <https://doi.org/10.3109/10715762.2010.498477>
- Guideline, O., The, F. O. R., & Of, T. (2009). Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay. *Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay, October*. <https://doi.org/10.1787/9789264076211-en>
- Guidelines, O., The, F. O. R., & Of, T. (2013). OECD guidelines for testing of chemicals. *Dermatotoxicology*, July, 509–511. <https://doi.org/10.3109/9781841848570-66>
- Guo, C. H., Huang, C. J., Chiou, Y. L., & Hsu, G. S. W. (2002). Alteration of trace element distribution and testis ACE activity in mice with high peritoneal aluminum. *Biological Trace Element Research*, 86(2), 145–157. <https://doi.org/10.1385/BTER:86:2:145>
- Gutiérrez-Noya, V. M., Gómez-Oliván, L. M., Ramírez-Montero, M. del C., Islas-Flores, H., Galar-Martínez, M., Dublán-García, O., & Romero, R. (2020). Ibuprofen at environmentally relevant concentrations alters embryonic development, induces teratogenesis and oxidative stress in *Cyprinus carpio*. *Science of the Total Environment*, 710, 136327. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136327>
- Haendel, M. A., Tilton, F., Bailey, G. S., & Tanguay, R. L. (2004). Developmental toxicity of the dithiocarbamate pesticide sodium metam in Zebrafish. *Toxicological Sciences*, 81(2), 390–

400. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh202>

Hagerman, A. E., Dean, R. T., & Davies, M. J. (2003). Radical chemistry of epigallocatechin gallate and its relevance to protein damage. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 414(1), 115–120. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00158-9)

Hansen, J. M. (2006). Oxidative stress as a mechanism of teratogenesis. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 78(4), 293–307. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20085>

Hansen, J. M., Jacob, B. R., & Piorczynski, T. B. (2018). Oxidative stress during development: Chemical-induced teratogenesis. *Current Opinion in Toxicology*, 7(2017), 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.11.003>

Harris, W. R., Wang, Z., & Hamada, Y. Z. (2003). Competition between transferrin and the serum ligands citrate and phosphate for the binding of aluminum. *Inorganic Chemistry*, 42(10), 3262–3273. <https://doi.org/10.1021/ic026027w>

Hasan, M. K., Alam, S., Mirkovic, J., & Hossain, M. F. (2018). Screening of Human Proteins for Fluoride and Aluminum Binding. *Bioinformation*, 14(02), 68–74. <https://doi.org/10.6026/97320630014068>

Hermesen, S. A. B., van den Brandhof, E. J., van der Ven, L. T. M., & Piersma, A. H. (2011). Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies. *Toxicology in Vitro*, 25(3), 745–753. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.01.005>

Hernández, A., (2002). El cuidado del medio ambiental: análisis, reseñas, propuestas, crónicas, tesis, concepciones y paradigmas, UAEM, 23-24

Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., & Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate

for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*, 86(1), 6–19.

<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>

Hossain, M. A., Piyatida, P., da Silva, J. A. T., & Fujita, M. (2012). Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *Journal of Botany*, 2012(Cd), 1–37. <https://doi.org/10.1155/2012/872875>

Illés, E., Takács, E., Dombi, A., Gajda-Schranz, K., Rácz, G., Gonter, K., & Wojnárovits, L. (2013). Hydroxyl radical induced degradation of ibuprofen. *Science of the Total Environment*, 447, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.007>

Irie, M., Asami, S., Ikeda, M., & Kasai, H. (2003). Depressive state relates to female oxidative DNA damage via neutrophil activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311(4), 1014–1018. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.10.105>

Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., Colín-Cruz, A., Neri-Cruz, N., & García-Medina, S. (2013). Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.025>

Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Neri-Cruz, N., & Dublán-García, O. (2014). Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(7), 5157–5166. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2477-0>

Islas-Flores, H., Manuel Gómez-Oliván, L., Galar-Martínez, M., Michelle Sánchez-Ocampo, E., SanJuan-Reyes, N., Ortiz-Reynoso, M., & Dublán-García, O. (2017a). Cyto-genotoxicity

and oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to a mixture of ibuprofen and diclofenac. *Environmental Toxicology*, 32(5), 1637–1650.

<https://doi.org/10.1002/tox.22392>

Islas-Flores, H., Manuel Gómez-Oliván, L., Galar-Martínez, M., Michelle Sánchez-Ocampo, E., SanJuan-Reyes, N., Ortiz-Reynoso, M., & Dublán-García, O. (2017b). Cyto-genotoxicity and oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to a mixture of ibuprofen and diclofenac. *Environmental Toxicology*, 32(5), 1637–1650.

<https://doi.org/10.1002/tox.22392>

Irazusta, V., Moreno-Cermeño A., Ros, J., & Tamarit, J., (2008). Estrategias proteómicas para el análisis de grupos carbonilo como marcadores de daño oxidativo en proteínas. *Proteómica*. 2(1), 51-58.

Iwamura, A., Nakajima, M., Oda, S., & Yokoi, T. (2017). Toxicological potential of acyl glucuronides and its assessment. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 32(1), 2–11.

<https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2016.11.002>

Jamil, A., Mahboob, A., & Ahmed, T. (2016). Ibuprofen targets neuronal pentraxins expression and improves cognitive function in mouse model of AICl₃-induced neurotoxicity. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 11(2), 601–606. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2928>

Jezierska, B., Ługowska, K., & Witeska, M. (2009). The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(4), 625–640.

<https://doi.org/10.1007/s10695-008-9284-4>

Jiang, W. D., Qu, B., Feng, L., Jiang, J., Kuang, S. Y., Wu, P., Tang, L., Tang, W. N., Zhang, Y. A., Zhou, X. Q., & Liu, Y. (2016). Histidine prevents Cu-induced oxidative stress and the

associated decreases in mRNA from encoding tight junction proteins in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *PLoS ONE*, 11(6), 1–19.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157001>

Jolly, S., Jaffal, A., Delahaut, L., Palluel, O., Porcher, J. M., Geffard, A., Sanchez, W., & Betoulle, S. (2014). Effects of aluminium and bacterial lipopolysaccharide on oxidative stress and immune parameters in roach, *Rutilus rutilus* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(22), 13103–13117. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3227-7>

Jones, H. S., Trollope, H. T., Hutchinson, T. H., Panter, G. H., & Chipman, J. K. (2012). Metabolism of ibuprofen in zebrafish larvae. *Xenobiotica*, 42(11), 1069–1075.

<https://doi.org/10.3109/00498254.2012.684410>

Joseph, L., Jun, B. M., Flora, J. R. V., Park, C. M., & Yoon, Y. (2019). Removal of heavy metals from water sources in the developing world using low-cost materials: A review. *Chemosphere*, 229, 142–159. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.198>

Kari, G., Rodeck, U., & Dicker, A. P. (2007). Zebrafish: An emerging model system for human disease and drug discovery. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 82(1), 70–80.

<https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100223>

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., & Guwy, A. J. (2008). The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research*, 42(13), 3498–3518.

<https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.04.026>

Kaushal, J., Mehandia, S., Singh, G., Raina, A., & Arya, S. K. (2018). Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*,

16, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.035>

Kawakami, Y., Raya, Á., Raya, R. M., Rodriguez-Esteban, C., & Izpisua Belmonte, J. C. (2005).

Retinoic acid signalling links left-right asymmetric patterning and bilaterally symmetric somitogenesis in the zebrafish embryo. *Nature*, *435*(7039), 165–171.

<https://doi.org/10.1038/nature03512>

Khadir, A., Negarestani, M., & Motamedi, M. (2020). Optimization of an electrocoagulation unit for

purification of ibuprofen from drinking water: Effect of conditions and linear/non-linear isotherm study. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*.

<https://doi.org/10.1080/01496395.2020.1770795>

Khan, M. D., Mei, L., Ali, B., Chen, Y., Cheng, X., & Zhu, S. J. (2013). Cadmium-induced

upregulation of lipid peroxidation and reactive oxygen species caused physiological, biochemical, and ultrastructural changes in upland cotton seedlings. *BioMed Research International*, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/374063>

<https://doi.org/10.1155/2013/374063>

Khatri, N., & Tyagi, S. (2015). Influences of natural and anthropogenic factors on surface and

groundwater quality in rural and urban areas. *Frontiers in Life Science*, *8*(1), 23–39.

<https://doi.org/10.1080/21553769.2014.933716>

Khetan, S. K., & Collins, T. J. (2007). Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A

challenge to green chemistry. *Chemical Reviews*, *107*(6), 2319–2364.

<https://doi.org/10.1021/cr020441w>

Kim, J. J., Kim, Y. S., & Kumar, V. (2019). Heavy metal toxicity: An update of chelating

therapeutic strategies. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *54*(May), 226–

231. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.05.003>

- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310.
<https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Klein, G. L. (2019). Aluminum toxicity to bone: A multisystem effect? *Osteoporosis and Sarcopenia*, 5(1), 2–5. <https://doi.org/10.1016/j.afos.2019.01.001>
- Kortenkamp, A., Faust, M., Backhaus, T., Altenburger, R., Scholze, M., Müller, C., Ermiler, S., Posthuma, L., & Brack, W. (2019). Mixture risks threaten water quality: the European Collaborative Project SOLUTIONS recommends changes to the WFD and better coordination across all pieces of European chemicals legislation to improve protection from exposure of the aquatic environment to . *Environmental Sciences Europe*, 31(1).
<https://doi.org/10.1186/s12302-019-0245-6>
- Kovřížnych, J. A., Sotříková, R., Zeljenková, D., Rollerová, E., Szabová, E., & Wimmerová, S. (2013). Acute toxicity of 31 different nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) tested in adulthood and in early life stages - Comparative study. *Interdisciplinary Toxicology*, 6(2), 67–73. <https://doi.org/10.2478/intox-2013-0012>
- Kumar, V., Bal, A., & Gill, K. D. (2009). Aluminium-induced oxidative DNA damage recognition and cell-cycle disruption in different regions of rat brain. *Toxicology*, 264(3), 137–144.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.05.011>
- Kumar, V., & Gill, K. D. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aluminium neurotoxicity and its amelioration: A review. *NeuroToxicology*, 41, 154–166.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.02.004>
- Laher, I. (2014). Systems biology of free radicals and antioxidants. *Systems Biology of Free*

Radicals and Antioxidants, 9783642300, 1–4178. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30018-](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30018-9)

9

Láng, J., & Kohidai, L. (2012). Effects of the aquatic contaminant human pharmaceuticals and their mixtures on the proliferation and migratory responses of the bioindicator freshwater ciliate *Tetrahymena*. *Chemosphere*, 89(5), 592–601.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.058>

Lapworth D.J., Baran N., Stuart M.E., & Ward R.S., (2012), Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence, *Environ. Pollut.*, 163, 287-303. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.034>

Laquaz, M., Dagot, C., Bazin, C., Bastide, T., Gaschet, M., Ploy, M. C., & Perrodin, Y. (2018).

Ecotoxicity and antibiotic resistance of a mixture of hospital and urban sewage in a wastewater treatment plant. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(10), 9243–9253. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9957-6>

Lee, S. H., Kang, J. W., Lin, T., Lee, J. E., & Jin, D. Il. (2013). Teratogenic potential of antiepileptic drugs in the zebrafish model. *BioMed Research International*, 2013.

<https://doi.org/10.1155/2013/726478>

Li, G., Xie, F., Zhang, J., Wang, J., Yang, Y., & Sun, R. (2016). Occurrence of phosphorus, iron, aluminum, silica, and calcium in a eutrophic lake during algae bloom sedimentation. *Water Science and Technology*, 74(6), 1266–1273. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.277>

Li, X. (2012). Improved pyrogallol autoxidation method: A reliable and cheap superoxide-scavenging assay suitable for all antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(25), 6418–6424. <https://doi.org/10.1021/jf204970r>

- Liu, H. Q., Lam, J. C. W., Li, W. W., Yu, H. Q., & Lam, P. K. S. (2017). Spatial distribution and removal performance of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment plants in China. *Science of the Total Environment*, 586, 1162–1169.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.107>
- Liu, W. X., Li, X. D., Shen, Z. G., Wang, D. C., Wai, O. W. H., & Li, Y. S. (2003). Multivariate statistical study of heavy metal enrichment in sediments of the Pearl River Estuary. *Environmental Pollution*, 121(3), 377–388. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00234-8)
- Loaiza-Ambuludi, S., Panizza, M., Oturan, N., Özcan, A., & Oturan, M. A. (2013). Electro-Fenton degradation of anti-inflammatory drug ibuprofen in hydroorganic medium. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 702, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2013.05.006>
- Long, R. S., Boettcher, E., & Crawford, D. (2017). Current and Future Uses of Aluminum in the Automotive Industry. *Jom*, 69(12), 2635–2639. <https://doi.org/10.1007/s11837-017-2554-9>
- López-portillo, J. (2019). *Los manglares como bioindicadores*. December.
<https://doi.org/10.26359/epomex.0519>
- López González, E. C., Siroski, P. A., & Poletta, G. L. (2019). Genotoxicity induced by widely used pesticide binary mixtures on *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman). *Chemosphere*, 232, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.218>
- Luja-Mondragón, M., Gómez-Oliván, L. M., SanJuan-Reyes, N., Islas-Flores, H., Orozco-Hernández, J. M., Heredia-García, G., Galar-Martínez, M., & Dublán-García, O. (2019). Alterations to embryonic development and teratogenic effects induced by a hospital effluent on *Cyprinus carpio* oocytes. *Science of the Total Environment*, 660, 751–764.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.072>

- Madikizela, L. M., & Chimuka, L. (2017). Occurrence of naproxen, ibuprofen, and diclofenac residues in wastewater and river water of KwaZulu-Natal Province in South Africa. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(7). <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6069-1>
- Magnarelli, G. (2015). Exposición ambiental a plaguicidas: biomarcadores en matrices de la tríada madre-placenta-feto. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 49(1), 39–53.
- Mahdi Ahmed, M., Doumenq, P., Awaleh, M. O., Syakti, A. D., Asia, L., & Chiron, S. (2017). Levels and sources of heavy metals and PAHs in sediment of Djibouti-city (Republic of Djibouti). *Marine Pollution Bulletin*, 120(1–2), 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.05.055>
- Maheswari, S. L., Murali, R. V., & Balaji, R. (2014). Aluminium induced cholinotoxicity in zebra fish brain -A sequel of oxidative stress. *International Journal of Advanced Research Journalwww.Journalijar.Com INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH*, 2(2), 322–335.
- Manku, G., Papadopoulos, P., Boisvert, A., & Culty, M. (2019). Cyclooxygenase 2 (COX2) expression and prostaglandin synthesis in neonatal rat testicular germ cells: Effects of acetaminophen and ibuprofen. *Andrology*, 2, 0–2. <https://doi.org/10.1111/andr.12727>
- MARKLUND, S., & MARKLUND, G. (1974). Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47(3), 469–474. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>
- Marsik, P., Rezek, J., Židková, M., Kramulová, B., Tauchen, J., & Vaněk, T. (2017). Non-steroidal

anti-inflammatory drugs in the watercourses of Elbe basin in Czech Republic.

Chemosphere, 171, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.055>

Martin-Diaz, L., Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., & Fabbri, E. (2009). Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 94(3), 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.06.015>

Martínez-vieyra, C., Galar-martínez, M., & G, L. M. (2017). *Chemosphere DNA damage and cytotoxicity induced on common carp by pollutants in water from an urban reservoir . Madin reservoir , a case study*. 185. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.072>

Mathiyazahan, D. B., Justin Thenmozhi, A., & Manivasagam, T. (2015). Protective effect of black tea extract against aluminium chloride-induced Alzheimer's disease in rats: A behavioural, biochemical and molecular approach. *Journal of Functional Foods*, 16, 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.001>

Matozzo, V., Rova, S., & Marin, M. G. (2012). The nonsteroidal anti-inflammatory drug, ibuprofen, affects the immune parameters in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Marine Environmental Research*, 79, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.06.003>

Maya, S., Prakash, T., Madhu, K. Das, & Goli, D. (2016a). Multifaceted effects of aluminium in neurodegenerative diseases: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 83, 746–754. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.035>

Maya, S., Prakash, T., Madhu, K. Das, & Goli, D. (2016b). Multifaceted effects of aluminium in neurodegenerative diseases: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 83, 746–754. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.035>

- McLachlan, D. R. C., Bergeron, C., Alexandrov, P. N., Walsh, W. J., Pogue, A. I., Percy, M. E., Kruck, T. P. A., Fang, Z., Sharfman, N. M., Jaber, V., Zhao, Y., Li, W., & Lukiw, W. J. (2019). Aluminum in Neurological and Neurodegenerative Disease. *Molecular Neurobiology*, 56(2), 1531–1538. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1441-x>
- Méndez-Arriaga, F., Torres-Palma, R. A., Pétrier, C., Esplugas, S., Gimenez, J., & Pulgarin, C. (2008). Ultrasonic treatment of water contaminated with ibuprofen. *Water Research*, 42(16), 4243–4248. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.05.033>
- Mezzelani, M., Gorbi, S., Da Ros, Z., Fattorini, D., d'Errico, G., Milan, M., Bargelloni, L., & Regoli, F. (2016). Ecotoxicological potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in marine organisms: Bioavailability, biomarkers and natural occurrence in *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 121, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.03.005>
- Michael, I., Achilleos, A., Lambropoulou, D., Torrens, V. O., Pérez, S., Petrović, M., Barceló, D., & Fatta-Kassinos, D. (2014). Proposed transformation pathway and evolution profile of diclofenac and ibuprofen transformation products during (sono)photocatalysis. *Applied Catalysis B: Environmental*, 147, 1015–1027. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2013.10.035>
- Michelena, T. M., Farrell, J. L., Winkler, D. A., Goodrich, C. A., Boylen, C. W., Sutherland, J. W., & Nierzwicki-Bauer, S. A. (2016). Aluminum toxicity risk reduction as a result of reduced acid deposition in Adirondack lakes and ponds. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(11). <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5589-4>
- Millecam, J., Van Bergen, T., Schauvliege, S., Antonissen, G., Martens, A., Chiers, K., Gehring, R., Gasthuys, E., Walle, J. Vande, Croubels, S., & Devreese, M. (2019). Developmental pharmacokinetics and safety of ibuprofen and its enantiomers in the conventional pig as

- 478)). *Journal of Clinical Investigation*, 105(7), 1023.
- Mugoni, V., Camporeale, A., & Santoro, M. M. (2014). Analysis of oxidative stress in Zebrafish embryos. *Journal of Visualized Experiments*, 89, 1–11. <https://doi.org/10.3791/51328>
- Mujika, J. I., Ruipérez, F., Infante, I., Ugalde, J. M., Exley, C., & Lopez, X. (2011). Pro-oxidant activity of aluminum: Stabilization of the aluminum superoxide radical ion. *Journal of Physical Chemistry A*, 115(24), 6717–6723. <https://doi.org/10.1021/jp203290b>
- Mujika, Jon I., Dalla Torre, G., & Lopez, X. (2018). Aluminum and Fenton reaction: How can the reaction be modulated by speciation? A computational study using citrate as a test case. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(23), 16256–16265. <https://doi.org/10.1039/c8cp02962h>
- Mustafa, H. N. (2020). Neuro-amelioration of cinnamaldehyde in aluminum-induced Alzheimer's disease rat model. *Journal of Histotechnology*, 43(1), 11–20. <https://doi.org/10.1080/01478885.2019.1652994>
- Na, G., Fang, X., Cai, Y., Ge, L., Zong, H., Yuan, X., Yao, Z., & Zhang, Z. (2013). Occurrence, distribution, and bioaccumulation of antibiotics in coastal environment of Dalian, China. *Marine Pollution Bulletin*, 69(1–2), 233–237. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.12.028>
- Nallani, G. C., Paulos, P. M., Constantine, L. A., Venables, B. J., & Huggett, D. B. (2011). Bioconcentration of ibuprofen in fathead minnow (*Pimephales promelas*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere*, 84(10), 1371–1377. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.05.008>
- Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.

<https://doi.org/10.1155/2019/9613090>

Niklasson, L., Sundh, H., Fridell, F., Taranger, G. L., & Sundell, K. (2011). Disturbance of the intestinal mucosal immune system of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), in response to long-term hypoxic conditions. *Fish and Shellfish Immunology*, 31(6), 1072–1080.

<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.09.011>

Novotny, V. (2003) *Water Quality: Diffuse Pollution and Watershed Management*, John Wiley & Sons, 25-26.

Nunes, M. E., Müller, T. E., Braga, M. M., Fontana, B. D., Quadros, V. A., Marins, A., Rodrigues, C., Menezes, C., Rosemberg, D. B., & Loro, V. L. (2017). Chronic Treatment with Paraquat Induces Brain Injury, Changes in Antioxidant Defenses System, and Modulates Behavioral Functions in Zebrafish. *Molecular Neurobiology*, 54(6), 3925–3934.

<https://doi.org/10.1007/s12035-016-9919-x>

Nwanyanwu, C. E., & Adieze, I. E. (2017). *Combined effects of metals and chlorophenols on dehydrogenase activity of bacterial consortium Combined effects of metals and chlorophenols on dehydrogenase activity of bacterial consortium*. 6(April), 10–20.

Oberholster, P. J., Myburgh, J. G., Ashton, P. J., Coetzee, J. J., & Botha, A. M. (2012a).

Bioaccumulation of aluminium and iron in the food chain of Lake Loskop, South Africa. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 75(1), 134–141.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.08.018>

Oberholster, P. J., Myburgh, J. G., Ashton, P. J., Coetzee, J. J., & Botha, A. M. (2012b).

Bioaccumulation of aluminium and iron in the food chain of Lake Loskop, South Africa. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 75(1), 134–141.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.08.018>

OECD. (2013). Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, July*, 1–22.

<https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>

Ogueji, E. O., Nwani, C. D., Iheanacho, S. C., Mbah, C. E., Okeke, O. C., & Usman, I. B. (1060). Acute toxicity of ibuprofen on selected biochemical and oxidative stress parameters of liver in *Clarias gariepinus* Juveniles (Burchell, 1822). *Journal of Entomology and Zoology Studies JEZS*, 5(54), 1060–1068.

Oost, D., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)

Oviedo-Gómez, D. G. C., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Razo-Estrada, C., & Gómez-Oliván, L. M. (2010). Diclofenac-enriched artificial sediment induces oxidative stress in *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 29(1), 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.09.004>

Parolini, M., & Binelli, A. (2012). Sub-lethal effects induced by a mixture of three non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology*, 21(2), 379–392. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0799-6>

Parolini, M., Binelli, A., & Provini, A. (2011a). Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(6), 1586–1594. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.025>

Parolini, M., Binelli, A., & Provini, A. (2011b). Chronic effects induced by ibuprofen on the

- freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(6), 1586–1594. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.025>
- Pašková, V., Hilscherová, K., & Bláha, L. (2011). Mechanisms of hexavalent chromium resistance and removal by microorganisms. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 211* (Vol. 233). <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8011-3>
- Paulsen, C. E., & Carroll, K. S. (2013). Cysteine-mediated redox signaling: Chemistry, biology, and tools for discovery. *Chemical Reviews*, 113(7), 4633–4679. <https://doi.org/10.1021/cr300163e>
- Peltzer, P. M., Lajmanovich, R. C., Martinuzzi, C., Attademo, A. M., Curi, L. M., & Sandoval, M. T. (2019). Biototoxicity of diclofenac on two larval amphibians: Assessment of development, growth, cardiac function and rhythm, behavior and antioxidant system. *Science of the Total Environment*, 683, 624–637. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.275>
- Peña Hernández, M. A. (2008). *Evaluación del efecto de la temperatura en la teratogenicidad del mercurio en embriones del pez cebra, método (DarTa)*. <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/xmlui/handle/231104/1700>
- Pérez-Alvarez, I., Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L. M., Barceló, D., López De Alda, M., Pérez Solsona, S., Sánchez-Aceves, L., SanJuan-Reyes, N., & Galar-Martínez, M. (2018). Determination of metals and pharmaceutical compounds released in hospital wastewater from Toluca, Mexico, and evaluation of their toxic impact. *Environmental Pollution*, 240, 330–341. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.116>
- Q, R. R., Turrensll, J. F., Changll, L. Y., Bush, K. M., Crapoll, J. D., & Freeman, B. A. (1991). *Detection of Catalase in Rat Heart Mitochondria* *. c, 22028–22034.

- Quiroga-Santos, E. H., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Gasca-Pérez, E., Cano-Viveros, S., Ruíz-Lara, K., Gómez-Oliván, L. M., & Islas-Flores, H. (2021). Geno-cytotoxicity and congenital malformations produced by relevant environmental concentrations of aluminum, diclofenac and their mixture on *Cyprinus carpio*. An interactions study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 82(August 2020). <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103555>
- Radović, T., Grujić, S., Petković, A., Dimkić, M., & Laušević, M. (2015). Determination of pharmaceuticals and pesticides in river sediments and corresponding surface and ground water in the Danube River and tributaries in Serbia. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(1). <https://doi.org/10.1007/s10661-014-4092-z>
- Rawy, S. M., Morsy, G. M., & Elshibani, M. M. (2013). Lethality, accumulation and toxicokinetics of aluminum in some tissues of male albino rats. *Toxicology and Industrial Health*, 29(3), 254–263. <https://doi.org/10.1177/0748233711432576>
- Razo-Estrada, A. C., García-Medina, S., Madrigal-Bujaidar, E., Gómez-Oliván, L. M., & Galar-Martínez, M. (2013). Aluminum-induced oxidative stress and apoptosis in liver of the common carp, *cyprinus carpio*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 224(5). <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1510-8>
- Reutova, N. V., Reutova, T. V., Dreeva, F. R., Khutuev, A. M., & Kerimov, A. A. (2018). Features of Aluminum Concentrations in Rivers of the Mountain Zone of the Central Caucasus. *Russian Journal of General Chemistry*, 88(13), 2884–2892. <https://doi.org/10.1134/S1070363218130091>
- Richardson, S. D., & Kimura, S. Y. (2017). Emerging environmental contaminants: Challenges facing our next generation and potential engineering solutions. *Environmental Technology and Innovation*, 8, 40–56. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2017.04.002>

- Richardson, S. D., & Ternes, T. A. (2014). Water analysis: Emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, 86(6), 2813–2848. <https://doi.org/10.1021/ac500508t>
- Richetti, S. K., Rosemberg, D. B., Ventura-Lima, J., Monserrat, J. M., Bogo, M. R., & Bonan, C. D. (2011). Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *NeuroToxicology*, 32(1), 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.11.001>
- Rocha, M., Singh, N., Ahsan, K., Beiriger, A., & Prince, V. E. (2020). Neural crest development: insights from the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 249(1), 88–111. <https://doi.org/10.1002/dvdy.122>
- Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V., & Reiter, R. J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*, 36(1), 1–9. <https://doi.org/10.1046/j.1600-079X.2003.00092.x>
- Rozas, O., Vidal, C., Baeza, C., Jardim, W. F., Rossner, A., & Mansilla, H. D. (2016). Organic micropollutants (OMPs) in natural waters: Oxidation by UV/H₂O₂ treatment and toxicity assessment. *Water Research*, 98, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.069>
- Rub, M. A., Azum, N., Kumar, D., Asiri, A. M., & Marwani, H. M. (2014). Micellization and microstructural studies between amphiphilic drug ibuprofen with non-ionic surfactant in aqueous urea solution. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 74, 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2014.01.005>
- Ruipérez, F., Mujika, J. I., Ugalde, J. M., Exley, C., & Lopez, X. (2012). Pro-oxidant activity of aluminum: Promoting the Fenton reaction by reducing Fe(III) to Fe(II). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 117, 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.09.008>

Sánchez-Iglesias, S., Méndez-Álvarez, E., Iglesias-González, J., Muñoz-Patiño, A., Sánchez-Sellero, I., Labandeira-García, J. L., & Soto-Otero, R. (2009a). Brain oxidative stress and selective behaviour of aluminium in specific areas of rat brain: Potential effects in a 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, *109*(3), 879–888.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06019.x>

Sánchez-Iglesias, S., Méndez-Álvarez, E., Iglesias-González, J., Muñoz-Patiño, A., Sánchez-Sellero, I., Labandeira-García, J. L., & Soto-Otero, R. (2009b). Brain oxidative stress and selective behaviour of aluminium in specific areas of rat brain: Potential effects in a 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, *109*(3), 879–888.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06019.x>

Santore, R. C., Ryan, A. C., Kroglund, F., Rodriguez, P. H., Stubblefield, W. A., Cardwell, A. S., Adams, W. J., & Nordheim, E. (2018). Development and application of a biotic ligand model for predicting the chronic toxicity of dissolved and precipitated aluminum to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *37*(1), 70–79.
<https://doi.org/10.1002/etc.4020>

Santos, L. H. M. L. M., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., & Montenegro, M. C. B. S. M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, *175*(1–3), 45–95.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100>

Santos, R. X., Correia, S. C., Zhu, X., Smith, M. A., Moreira, P. I., Castellani, R. J., Nunomura, A., & Perry, G. (2013). Mitochondrial DNA oxidative damage and repair in aging and Alzheimer's disease. *Antioxidants and Redox Signaling*, *18*(18), 2444–2457.
<https://doi.org/10.1089/ars.2012.5039>

- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., & Voelker, D. (2008). The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - Applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research*, 15(5), 394–404.
<https://doi.org/10.1007/s11356-008-0018-z>
- Schroniltgen, I., Barragan, R., Barato, P., & Eslava-mocha, P. R. (2007). Importancia del ciclo biogeoquímico del aluminio (Al) con relación con la acidez de los suelos en la producción piscícola y la salud pública ¿cuál sería el caso de la Orinoquia? *Orinoquia*, 11(2), 81–94.
<https://doi.org/10.22579/20112629.164>
- Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). (2005). *Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures*. December, 1–50.
- SEDUE. (1989). Acuerdo Por El Que Se Establecen Los Criterios Ecologicos De Calidad Del Agua Ce-Cca-001 / 89. *Diario Oficial de La Federación*, 1–18.
- Selderslaghs, I. W. T., Van Rompay, A. R., De Coen, W., & Witters, H. E. (2009). Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reproductive Toxicology*, 28(3), 308–320.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.05.004>
- Senger, M. R., Seibt, K. J., Ghisleni, G. C., Dias, R. D., Bogo, M. R., & Bonan, C. D. (2011). Aluminum exposure alters behavioral parameters and increases acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Cell Biology and Toxicology*, 27(3), 199–205.
<https://doi.org/10.1007/s10565-011-9181-y>
- Sivakumar, S., Khatiwada, C. P., & Sivasubramanian, J. (2012). Bioaccumulations of aluminum and the effects of chelating agents on different organs of *Cirrhinus mrigala*. *Environmental*

- Toxicology and Pharmacology*, 34(3), 791–800. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.09.007>
- Song, Y., Chai, T., Yin, Z., Zhang, X., Zhang, W., Qian, Y., & Qiu, J. (2018). Stereoselective effects of ibuprofen in adult zebrafish (*Danio rerio*) using UPLC-TOF/MS-based metabolomics. *Environmental Pollution*, 241, 730–739. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.009>
- Sousa, J. C. G., Ribeiro, A. R., Barbosa, M. O., Pereira, M. F. R., & Silva, A. M. T. (2018). A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 146–162. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.09.058>
- Spitsbergen, J. M., & Kent, M. L. (2003). The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research - Advantages and current limitations. *Toxicologic Pathology*, 31(SUPPL.), 62–87. <https://doi.org/10.1080/01926230390174959>
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25(3–4), 207–218. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0011-2>
- Strmac, M. (2002). Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae. *Journal of Fish Biology*, 61(1), 24–38. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2002.1919>
- Sun, X., Wang, H., Huang, W., Yu, H., Shen, T., Song, M., Han, Y., Li, Y., & Zhu, Y. (2017). Inhibition of bone formation in rats by aluminum exposure via Wnt/B-catenin pathway. *Chemosphere*, 176, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.086>
- Supriadi, R. F., Permata, T. R., Norisa, N., Khotimah, H., Ali, M., Widodo, M. A., Kalsum, U., &

- Nurdiana. (2019). Centella asiatica protect the development of aluminum-induced zebrafish larvae. *AIP Conference Proceedings*, 2108(June). <https://doi.org/10.1063/1.5110005>
- Szutowicz, A., Bielarczyk, H., Jankowska-Kulawy, A., Ronowska, A., & Pawelczyk, T. (2015). Retinoic acid as a therapeutic option in Alzheimer's disease: A focus on cholinergic restoration. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 15(3), 239–249. <https://doi.org/10.1586/14737175.2015.1008456>
- Takahashi, T., Hagiwara, A., & Ogiwara, K. (2018). Prostaglandins in teleost ovulation: A review of the roles with a view to comparison with prostaglandins in mammalian ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 461, 236–247. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.09.019>
- Takeuchi, K., Smale, S., Premchand, P., Maiden, L., Sherwood, R., Thjodleifsson, B., Bjornsson, E., & Bjarnason, I. (2006). Prevalence and mechanism of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced clinical relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4(2), 196–202. [https://doi.org/10.1016/S1542-3565\(05\)00980-8](https://doi.org/10.1016/S1542-3565(05)00980-8)
- Tenorio-Chávez, P., Cerro-López, M., Castro-Pastrana, L. I., Ramírez-Rodríguez, M. M., Orozco-Hernández, J. M., & Gómez-Oliván, L. M. (2020). Effects of effluent from a hospital in Mexico on the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. *Science of the Total Environment*, 727. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138716>
- Tle, H. G., Dowling, J. E., & Cameron, D. J. (2012). Early retinoic acid deprivation in developing zebrafish results in microphthalmia. *Visual Neuroscience*, 29(4–5), 219–228. <https://doi.org/10.1017/S0952523812000296>

- Ton, C., Lin, Y., & Willett, C. (2006). Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. *Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology*, 76(7), 553–567.
<https://doi.org/10.1002/bdra.20281>
- Trenfield, M. A., Markich, S. J., Ng, J. C., Noller, B., & van Dam, R. A. (2012a). Dissolved organic carbon reduces the toxicity of aluminum to three tropical freshwater organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(2), 427–436. <https://doi.org/10.1002/etc.1704>
- Trenfield, M. A., Markich, S. J., Ng, J. C., Noller, B., & van Dam, R. A. (2012b). Dissolved organic carbon reduces the toxicity of aluminum to three tropical freshwater organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(2), 427–436. <https://doi.org/10.1002/etc.1704>
- Tsume, Y., Langguth, P., Garcia-Arieta, A., & Amidon, G. L. (2012). In silico prediction of drug dissolution and absorption with variation in intestinal pH for BCS class II weak acid drugs: Ibuprofen and ketoprofen. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 33(7), 366–377.
<https://doi.org/10.1002/bdd.1800>
- Urso, M. L., & Clarkson, P. M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189(1–2), 41–54. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00151-3](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00151-3)
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178–189.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161–1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>

- Van Anholt, R. D., Spanings, F. A. T., Nixon, O., Wendelaar Bonga, S. E., & Koven, W. M. (2012). The effects of arachidonic acid on the endocrine and osmoregulatory response of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) acclimated to seawater and subjected to confinement stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(3), 703–713. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9552-6>
- Vasquez, M. I., Lambrianides, A., Schneider, M., Kümmerer, K., & Fatta-Kassinos, D. (2014). Environmental side effects of pharmaceutical cocktails: What we know and what we should know. *Journal of Hazardous Materials*, 279, 169–189. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.069>
- Venero J., 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Med. Militar*. 31 (2): 126-133.
- Venditti, P., Di Stefano, L., & Di Meo, S. (2013). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*, 13(2), 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.01.008>
- Vignal, C., Desreumaux, P., & Body-Malapel, M. (2016). Gut: An underestimated target organ for Aluminum. *Morphologie*, 100(329), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2016.01.003>
- Vilando, A. C., Caparanga, A. R., & Lu, M. C. (2019). Enhanced recovery of aluminum from wastewater using a fluidized bed homogeneously dispersed granular reactor. *Chemosphere*, 223, 330–341. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.086>
- Voigt, C. L., da Silva, C. P., Doria, H. B., Randi, M. A. F., de Oliveira Ribeiro, C. A., & de Campos, S. X. (2015). Bioconcentration and bioaccumulation of metal in freshwater Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11), 8242–8252. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3967-4>

- Vu, C. T., Lin, C., Shern, C. C., Yeh, G., Le, V. G., & Tran, H. T. (2017). Contamination, ecological risk and source apportionment of heavy metals in sediments and water of a contaminated river in Taiwan. *Ecological Indicators*, 82(January), 32–42.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.06.008>
- Vuorinen, P. J., Keinänen, M., Peuranen, S., & Tigerstedt, C. (2003). Reproduction, blood and plasma parameters and gill histology of vendace (*Coregonus albula* L.) in long-term exposure to acidity and aluminum. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54(3), 255–276. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00078-7)
- Wagner, S., Lang, S., Popp, T., Schmidt, A., Thiermann, H., Steinritz, D., & Kehe, K. (2019). Evaluation of selective and non-selective cyclooxygenase inhibitors on sulfur mustard-induced pro-inflammatory cytokine formation in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicology Letters*, 312(December 2018), 109–117.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.03.012>
- Ward, R. J. S., McCrohan, C. R., & White, K. N. (2006). Influence of aqueous aluminium on the immune system of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Aquatic Toxicology*, 77(2), 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.12.006>
- Wardhani, P. A. (2015). 濟無No Title No Title. *Efikasi Diri Dan Pemahaman Konsep IPA Dengan Hasil Belajar Ilmu Pengetahuan Alam Siswa Sekolah Dasar Negeri Kota Bengkulu*, 6.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Weigel, S., Berger, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thoresen, H., & Hühnerfuss, H. (2004). Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere*, 56(6), 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.015>

- Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., & Broschard, T. H. (2011). Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology*, *281*(1–3), 25–36.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.01.004>
- Wells, P. G., Bhuller, Y., Chen, C. S., Jeng, W., Kasapinovic, S., Kennedy, J. C., Kim, P. M., Laposa, R. R., McCallum, G. P., Nicol, C. J., Parman, T., Wiley, M. J., & Wong, A. W. (2005). Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *207*(2 SUPPL.), 354–366.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.01.061>
- Wilhelm, E. A., Jesse, C. R., Leite, M. R., & Nogueira, C. W. (2009). Studies on preventive effects of diphenyl diselenide on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Pathophysiology*, *16*(1), 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2008.12.002>
- Wilhelm Filho, D., Torres, M. A., Zaniboni-Filho, E., & Pedrosa, R. C. (2005). Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture*, *244*(1–4), 349–357.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.024>
- Wong, C. M., Cheema, A. K., Zhang, L., & Suzuki, Y. J. (2008). Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. *Circulation Research*, *102*(3), 310–318.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.159814>
- Wu, C., Zhang, Y., Chai, L., & Wang, H. (2017). Oxidative stress , endocrine disruption , and malformation of *Bufo gargarizans* embryo exposed to sub-lethal cadmium concentrations. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *49*, 97–104.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.12.005>

- Wu, J., Du, F., Zhang, P., Khan, I. A., Chen, J., & Liang, Y. (2005). Thermodynamics of the interaction of aluminum ions with DNA: Implications for the biological function of aluminum. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(5), 1145–1154.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.02.010>
- Xia, L., Zheng, L., & Zhou, J. L. (2017a). Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 182, 416–425. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.054>
- Xia, L., Zheng, L., & Zhou, J. L. (2017b). Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 182, 416–425. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.054>
- Xiong, D., Fang, T., Yu, L., Sima, X., & Zhu, W. (2011). Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science of the Total Environment*, 409(8), 1444–1452.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.015>
- Yan, Z., & Spaulding, H. R. (2020). Extracellular superoxide dismutase, a molecular transducer of health benefits of exercise. *Redox Biology*, 32(March), 101508.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101508>
- Yao, H., & Rahman, I. (2011). Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254(2), 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.10.022>
- Yazidi, A., Saidi, S., Ben Mbarek, N., & Darragi, F. (2017). Contribution of GIS to evaluate surface water pollution by heavy metals: Case of Ichkeul Lake (Northern Tunisia). *Journal of African*

Earth Sciences, 134, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2017.06.009>

Yeh, S., Moffatt, B. A., Griffith, M., Xiong, F., Yang, D. S. C., Wiseman, S. B., Sarhan, F., Danyluk, J., Yi Qi Xue, Hew, C. L., Doherty-Kirby, A., & Lajoie, G. (2000). Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. *Plant Physiology*, 124(3), 1251–1263. <https://doi.org/10.1104/pp.124.3.1251>

Yokel, R. A., Lasley, S. M., & Dorman, D. C. (2006). The speciation of metals in mammals influences their toxicokinetics and toxicodynamics and therefore human health risk assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 9(1), 63–85. <https://doi.org/10.1080/15287390500196230>

Yousef, M. I. (2004). Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: Protective role of ascorbic acid. *Toxicology*, 199(1), 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.02.014>

Zhang, C., Willett, C., & Fremgen, T. (2003). Zebrafish: An Animal Model for Toxicological Studies. *Current Protocols in Toxicology*, 17(1), 1–18. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0107s17>

Zubair Alam, M., Ahmad, S., Malik, A., & Ahmad, M. (2010). Mutagenicity and genotoxicity of tannery effluents used for irrigation at Kanpur, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7), 1620–1628. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.07.009>

